

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25304043

研究課題名(和文) フィリピンでの人獣共通感染症のレズルボアとしての翼手目の総合的評価

研究課題名(英文) General evaluation of bats as reservoir of zoonosis in the Philippines

研究代表者

久和 茂 (Kyuwa, Shigeru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30177943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：翼手目(コウモリ類)は生物学的多様性とその分布・移動域の広さ、巨大なコロニー形成などの特徴をもつ特異な生物である。また、エボラウイルスなどの高病原性病原体の自然宿主と疑われており、病原体レズルボアとして高いリスクをもつ。本研究はフィリピンにおいて翼手目の保有病原体の疫学調査を実施し、翼手目の人獣共通感染症のレズルボアとしての評価を行うことを目的とした。

ミンダナオ島、ルソン島中央部、ルソン島北西部においてそれぞれ捕獲調査を行い、合計266匹の翼手目を採取した。これらのサンプルより新規のレオウイルス、ハンタウイルスを見出し、さらに病原性細菌や原虫を保有していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bats are unique animals which are biologically diverse, distributed broadly and move wildly. Bats are suspected to be reservoirs of highly pathogenic agents such as ebolavirus. In this study we attempted to evaluate bats as reservoirs of zoonosis, surveying bats in the Philippines.

We carried out field studies in the Mindanao island, the center of the Luzon and Northwest part of the Luzon, 266 bats were caught. We isolated new reovirus and hantavirus from the samples we obtained, and also found that bats had pathogenic bacteria and protozoans.

研究分野：ウイルス学

キーワード：翼手目 ウイルス フィリピン 国際研究者交流 感染症 細菌 原虫 疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 翼手目(コウモリ)は極地を除く世界中に分布し、哺乳動物 4000 種のうち、げっ歯類 2000 種に次ぐ多様性を持った哺乳動物であり、約 1000 に及ぶ種から構成されている。哺乳類でありながら空を飛び、1 個体の持つテリトリーは広域にわたる。多様性とその分布、移動域の広さは翼手目の大きな特徴である。さらに一群で数百～数千万匹という巨大なコロニーを形成する特異な生態を持ち、一度病原体が侵入すると容易にコロニー内に拡がり、定着する可能性が高い。したがって、病原体レズルボアとしての翼手目のリスクは群を抜いている。

(2) 事実、1994 年にオーストラリアでヘンドラウイルス感染症が、1998 年にはマレーシアでニパウイルス感染症が発生し、いずれもオオコウモリ由来のウイルスが原因であることが明らかにされた。2005 年にはエボラウイルスや SARS 様コロナウイルスが翼手目から検出されている。これらのウイルス性疾患はヒトにおいて非常に高い致死率を示し BSL4 レベルの取り扱いが求められ、我が国の感染症法においても最も重要な 1 類感染症に分類されるものが多い。

(3) これまで行われてきた翼手目のウイルス保有調査は、新興感染症の発生があった場合にのみ集中的に行われた。いわば下流のヒトあるいは家畜を対象にした調査が主であり、上流、即ち翼手目の病原体保有状況について総合的に調査研究されたことはほとんどなかった。また、初期の研究は分離または検出されたウイルスの同定と遺伝子解析が主であった。疫学調査も特定の翼手目の種が特定の病原体を保有しているかどうかのみが記録されているだけである。具体的には、ウイルスで疫学調査の対象となっているのは狂犬病ウイルスとコウモリリッサウイルスなどに限局され、その他の病原体についての情報は乏しい。どのような病原体によるどの程度のリスクが存在するかについての科学的評価にはほど遠いレベルである。生態学、環境汚染評価のような上流(翼手目)からの解析方法が確立されておらず、翼手目の成長、加齢、性差、種差などの基盤情報が欠落しているおり、免疫機構など宿主防御の研究も皆無である。また、巨大な群れ社会を形成する群内及び翼手目間の病原体の伝播などに関するリスクシナリオも全く作成されていない。

(4) 申請者らは基盤研究(B)(海外)「霊長目および翼手目由来新興感染症に関する研究」(平成 16～18 年度、代表: 明石博臣)およびの基盤研究(B)(海外)「生物学的特徴及び環境影響を加味した翼手目由来感染症の総合的リスク評価」(平成 22～24 年度、代表: 久和茂)を通して、翼手目の免疫機能や

肝臓の解毒酵素に関する研究およびウイルスの抗体検出法の開発を行ってきた。この間、エボラウイルスや SARS 様コロナウイルスのレズルボアが翼手目である可能性が示されるなど、翼手目を介する新興感染症の危険性はますます高まっている。現在翼手目の国内への輸入は禁止されている。しかし、将来、病原体を保有した翼手目が東南アジアから直接侵入する可能性は残されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では翼手目の病原体保有状況を網羅的に解析し、その全貌を明らかにすることを目的とする。

(2) フィリピンにおける翼手目は島封じのため 5 つの動物叢に分割され、それぞれの動物叢毎に独自の進化を遂げた。その結果、フィリピンには世界に分布する翼手目の約 10 分の 1 (80 種以上) が生息している。これらの中にはオーストラリア(ヘンドラウイルス)、マレーシア(ニパウイルス)、中国(SARS 様コロナウイルス)と共通した種類の翼手目が存在する。このため、フィリピンの翼手目に焦点を当て、研究手法開発のリソースとすると共に、保有病原体の疫学研究等を通して、翼手目由来感染症のリスク評価と有効な制御法を開発することを最終目標とし、まず以下の項目について明らかとすることを旨とする。

翼手目における保有病原体の検索

(a) 特異的プライマーや特異抗原を用いた解析: コロナウイルス、エボラウイルスなど特定のウイルスを認識するプライマーセットや特異抗原を用いた疫学調査を実施する。
(b) ウイルスの網羅的解析: 研究分担者の水谷らはウイルスの網羅的検出法(RDV法)を開発している。次世代型シーケンサーを用いてフィリピンのコウモリ試料の網羅的解析を行い、コウモリが保有している病原体の全体像のあぶり出しを行う。

フィリピンにおける翼手目の分布と多様性: フィリピン大学自然史博物館の専門家と共同でフィリピンの翼手目の分布と多様性の基礎データを集積し、各動物叢(ルソン、パラワン、ミンダナオ、ネグロス、中間諸島の生物叢)から主要なオオコウモリ、小型コウモリの捕獲プランを作成し、病原体と翼手目の多様性、共進化過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) フィリピンの翼手目の捕獲調査

フィリピンにおける翼手目を含めた動物は、島封じのため多彩な分化を遂げた。申請者らはこれまでの研究を通じて、フィリピン大学ロスバニョス校獣医学部マサンガイ教授をフィリピン側代表とするグループと共同研究を行い、同校周辺、ルソン島マニラ地

区、パナイ島、ポリロ島、ミンダナオ島等で翼手目を捕獲し、疫学調査などを行い、その成果を発表してきた。フィリピン国内の翼手目の捕獲調査を実施するには事前にフィリピン政府の承認を受けなければならない。翼手目の捕獲ならびに種の同定については申請者らもかなりの経験を積んでおり、またフィリピン大学の翼手目研究専門家の協力があるので全く問題がない。捕獲した翼手目の安楽死、剖検、血清分離、糞便採取、臓器・組織の採材・保存には経験と技術が必要である。また、多頭数のコウモリの採材を行うにはそれなりの人数が必要である。研究参加予定者はいずれも申請者らと翼手目の捕獲・サンプリングを経験したことがあり、チームワークも確立している。

(2) 翼手目サンプルからの抗体および病原体遺伝子の検出

申請者らは既に翼手目から ヘルペスウイルス、ヘルペスウイルス、コロナウイルス、アデノウイルスなどのウイルス核酸の検出に成功している。これらの既に確立された実験系を用いて、フィリピンの翼手目から得られたサンプルについてこれらのウイルス遺伝子の検出を試みる。

また、近年他の研究者らにより翼手目からインフルエンザウイルス、ポリオーマウイルス、パピローマウイルス、ヘニパウイルス及びパラミクソウイルス、レオウイルス、ヘペウイルスのウイルス核酸が検出されている。フィリピンで捕獲された翼手目のサンプルについて、論文で報告されているウイルス特異的プライマーを用いて、ウイルス遺伝子の検出を試みた。

一方、病原体に対する特異抗体の検出も重要である。申請者らは既に組換えコウモリコロナウイルス N タンパク質を用いたウェスタンブロット法による抗コウモリコロナウイルス抗体の検出に成功している。また、同様に組換え抗原を用いたレストンエボラウイルス抗体の検出にも成功し、レストンエボラウイルスの自然宿主がフィリピン、ミャンマー、ニューギニア、インドネシアなどに生息している *Rousettus amplexicaudatus* である可能性を示唆した。本研究で得られたサンプルについても調査し、特異抗体の検出を実施した。

(3) 翼手目サンプルを用いたウイルス核酸の網羅的解析

上記のような個別の病原体の遺伝子あるいは特異抗体によるアプローチも重要であるが、ウイルス核酸を網羅的に検出する方法 (RDV; rapid determination of viral RNA sequence 法) が研究分担者である水谷らによって開発され、野生イノシシなどに応用されている。実際、申請者らはこの RDV 法を用いてフィリピンの翼手目から今までに報告の無かった全く新規の ヘルペスウイルスの

分離・同定にも成功している。また、国内の小型コウモリからウイルス分離にも成功している。このような網羅的解析を次世代型シーケンサーで行い、よりハイスループットな解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 平成 25 年 8 月 13~19 日までの 1 週間、日本から 7 名の研究者がフィリピンに赴き、地元フィリピン大学の研究者 6 名と一緒にミンダナオ諸島群で翼手目の捕獲調査を実施した。その結果、オオコウモリ 4 種 88 匹、ココウモリ 1 種 3 匹、合計 91 匹を捕獲した。

(2) 平成 26 年 2 月 10~15 日に日本から 6 名の研究者がフィリピンに赴き、地元フィリピン大学等の研究者等 7 名と一緒にフィリピン大学ロスバニョス校周辺で翼手目の捕獲調査を行った。その結果、オオコウモリ、ココウモリ、合計 91 匹を捕獲できた。原虫研究者からもサンプル提供の依頼があり、一部を供与した。

(3) 平成 28 年 2 月 21~26 日の 6 日間、フィリピン・ルソン島北西部のパンガシナン州マビニ市において翼手目の捕獲調査を実施した。日本から 11 名の研究者が参加した。マサンガイ教授ほかの地元フィリピンの研究者も 10 名近く参加し、大所帯となった。その結果、捕獲作業中の死亡個体を含め 84 匹の翼手目を採取することができた。気候的に、2 月はフィリピンでの翼手目採集にもっとも適した時期である。最終年度に捕獲したサンプルの解析は科研費の研究期間延長を行い、次年度に実施した。

(4) 捕獲調査で得たサンプルを用いて、ウイルス、細菌、原虫等の解析を行った。その結果、サマル島 Sion Bat Cave で捕獲されたヨアケオオコウモリ由来の咽頭スワブからウイルスが検出され、レオウイルス科オルソレオウイルス属の新しいウイルス (プテロパインオルソレオウイルス) が発見された。本ウイルスの疫学はまだ不明な点が多く、今後の研究の端緒となる可能性がある。また、新規のハンタウイルスも見出された。翼手目は食中毒の原因菌であるカンピロバクター・ジェジュニを持っていることやクロスポリジウムやアイメリアなどの原虫を保有していることも明らかになった。

(5) これらの結果から、翼手目はエボラウイルスなどの高病原性病原体のレゼルボアであるばかりでなく、細菌・原虫を含めた多様な人獣共通感染症のレゼルボアであることが明らかになった。

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 6 件)

Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Arch Virol, 査読有, in press
DOI: 10.1007/s00705-017-3251-2

Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibod MN, Morikawa S, Yanagihara R, Oishi K. Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harboured by the Geoffroy's rousette (*Rousettus amplexicaudatus*), a frugivorous bat species in the Philippines. Infect Genet Evol. 査読有, 45:26-32, 2016
DOI: 10.1016/j.meegid.2016.08.008

Hatta Y, Omatsu T, Tsuchiaka S, Katayama Y, Taniguchi S, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Eres E, Cosico E, Une Y, Yoshikawa Y, Maeda K, Kyuwa S, Mizutani T. Detection of *Campylobacter jejuni* in rectal swab samples from *Rousettus amplexicaudatus* in the Philippines. J Vet Med Sci. 査読有, 78:1347-1350, 2016
DOI: 10.1292/jvms.15-0621

Murakoshi F, Recuenco FC, Omatsu T, Sano K, Taniguchi S, Masangkay JS, Alviola P, Eres E, Cosico E, Alvarez J, Une Y, Kyuwa S, Sugiura Y, Kato K. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in Philippine bats. Parasitol Res. 査読有, 115:1863-1869, 2016
DOI: 10.1007/s00436-016-4926-4

Sano K, Okazaki S, Taniguchi S, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Eres E, Cosico E, Quibod N, Kondo T, Shinoda H, Hatta Y, Mitomo S, Oba M, Katayama Y, Sassa Y, Furuya T, Nagai M, Une Y, Maeda K, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Omatsu T, Mizutani T. Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines. Virus Genes, 査読有, 51:136-139, 2015

DOI: 10.1007/s11262-015-1197-6

Szczesniak M, Yoneda M, Sato H, Makalowska I, Kyuwa S, Sugano S, Suzuki Y, Makalowski W, Kai C. Characterization of the mitochondrial genome of *Rousettus leshenaulti*. Mitochondrial DNA, 査読有, 25:443-444, 2014
DOI: 10.3109/19401736.2013.809451

〔学会発表〕(計 10 件)

青木啓太、新井智、谷口怜、吉川泰弘、久和茂、多屋馨子、Joseph S Masangkay、大松勉、Roberto Puentespina、渡辺俊平、Phillip Alviola、森川茂、Richard Yanagihara、大石和徳、フィリピンのオオコウモリから検出された新規ハンタウイルスの遺伝子解析、第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月6~8日、日本大学生物資源科学部(神奈川県、藤沢市)

Satoru Arai, Satoshi Taniguchi, Keita Aoki, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Kyuwa, Keiko Tanaka-Taya, Joseph S Masangkay, Tsutomu Omatsu, Roberto Puentespina Jr, Shumpei Watanabe, Phillip Alviola, Eduardo Eres, Edison Cosico, Ma Nina Regina Quibod, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi, Newfound hantavirus in fruit bat, Republic of the Philippines. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 2016年10月23~25日、札幌国際会議場(北海道札幌市)

谷口怜、前田健、堀本泰介、Joseph S Masangkay、Roberto Puentespina Jr、大松勉、永田典代、江川和孝、福士秀悦、谷英樹、吉川泰弘、久和茂、下島昌幸、西條政幸、フィリピンのコウモリから分離されたプテロパインオルソレオウイルスの性状解析及び疫学的研究、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7~9日、北里大学獣医学部(青森県、十和田市)

江川和孝、下島昌幸、谷口怜、谷英樹、福間藍子、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、既存抗ウイルス薬によるプテロパインオルソレオウイルスの増殖抑制作用の検討、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7~9日、北里大学獣医学部(青森県、十和田市)

佐野芳、岡崎祥子、大松勉、前田健、久和茂、谷口怜、八田勇輝、三友俊平、大場真己、片山幸枝、佐々悠木子、古谷哲也、長井誠、水谷哲也、フィリピンの野生コウモリから検出された新規ヘルペスウイルス遺伝子、第157回日本獣医学会学術集会2014年9月9~12日、北海道大学高等教育

推進機構（北海道札幌市）

谷口 怜、堀本泰介、Masangkay Joseph、Puentenspina Roberto Jr、大松勉、永田典代、江川和孝、福士秀悦、谷英樹、下島昌幸、吉川泰弘、西條政幸、久和茂、前田健、フィリピンのコウモリからのネルソnbグループに分類されるオルソレオウイルスの分離、第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月 9～12 日、北海道大学高等教育推進機構（北海道札幌市）

谷口 怜、堀本泰介、Masangkay Joseph、Puentenspina Roberto Jr、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉川泰弘、西條政幸、久和茂、前田健、フィリピンのコウモリからのプテロパインオルソレオウイルスの分離、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10～12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

下田宙、竹之内惇、服部志保、Hassan Mahmoud、野口慧多、寺田豊、谷口 怜、久和茂、吉川泰弘、Joseph Masangkay、高崎智彦、鈴木和男、前田健、コウモリにおける日本脳炎ウイルス感染の調査、第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2013 年 5 月 24～25 日、ニューウェルシティ湯河原（神奈川県湯河原町）

谷口 怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂、フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20～22 日、岐阜大学農学部（岐阜県岐阜市）

谷口 怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂、フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症ウイルスに反応する抗体の検出、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10～12 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/jitsudo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久和 茂 (KYUWA, Shigeru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30177943

(2) 研究分担者

谷口 怜 (TANIGUCHI, Satoshi)

国立感染症研究所・ウイルス第 1 部・研究員

研究者番号：60734465

水谷 哲也 (MIZUTANI, Tetsuya)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：70281681

(3) 連携研究者

吉川 泰弘 (YOSHIKAWA, Yasuhiro)

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号：80109975

明石 博臣 (AKASHI, Hiroomi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：10334327

宇根 有美 (UNE, Yumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：40160303

(4) 研究協力者

前田 健 (MAEDA, Ken)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90284273