

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305015

研究課題名(和文) 熱帯地域に潜む未知の蚊媒介性ウイルスの網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive survey of arboviruses in the tropics

研究代表者

森田 公一 (MORITA, Kouichi)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：40182240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アジア、アフリカで急性発熱患者や蚊などの節足動物を採取して培養細胞を用いてウイルス分離を行った。分離したウイルスは既知のウイルスを検査した後、未同定のサンプルについて培養上清を蛋白分画と核酸分画に分け、前者はトリプシンで分解し質量分析計(nLC/MS)にてアミノ酸配列情報を、核酸分画は次世代シーケンサー(NGS)にて解析し遺伝子情報を得た。得られた情報をそれぞれ既存のマスコット解析とBLAST解析にて既知のウイルスタンパク、遺伝子との相同性を検索した。データベースでヒットしないアミノ酸配列と遺伝子配列について総当たりの相同検索を実施してこれまで存在が知られていなかったウイルスを複数発見した。

研究成果の概要(英文)：We collected several thousand clinical (sera) and environmental (mosquitoes) samples in the Philippines, Kenya, Myanmar, Nepal and Japan for virus isolation. Viruses were isolated by inoculating the samples to cultured cells such as mosquito cell line (C6/36) and mammalian cell lines (Vero, LLC-MK2, etc). Culture supernatant of cells showing cytopathic effect were subjected to PCR, nLC-MS assay and NGS sequencing. A number of known viruses were identified namely, dengue virus, chikungunya virus, Rift Valley fever virus and enteroviruses while some unidentified viruses e.g. Tanay virus and Tofla virus were recently recognized. In this research program, we established a procedure to facilitate the detection of unknown virus combining proteome and genome information.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アルボウイルス プロテオミクス ゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 熱帯地域においては感染症がまだ死亡原因の一位をしめている。なかでも蚊などの節足動物で媒介されるウイルス性感染症はデング出血熱や日本脳炎、西ナイル熱など多岐にわたり多数の患者が発生しており地球温暖化とともに増加・拡大が危惧されている。熱帯地域では蚊などが活動を強める時期にウイルス性と思われる急性発熱性疾患や脳炎患者で上記の既知ウイルスには陰性の症例が多数存在しており、未知の病原体の存在が示唆されている、実際、我々は過去にベトナムで全く新しい蚊媒介性ウイルスの Nam Dinh ウイルスを発見した(参考文献1, 2)。熱帯地域には、さらに多くの未知の病原性ウイルスが存在していることは明らかである。このためアジア・アフリカで生息する未知の蚊媒介性ウイルスを網羅的に同定しその活動状況、病原性を解明し、簡易診断法を開発しておく必要がある、

(2) 網羅的に病原体を同定する手技について我々は独自にタンパク質解析(プロテオミクス)による解析法を開発し(文献3)、他のグループは遺伝子解析(ゲノミクス)による解析法を開発した(文献4)。しかし共に弱点は全く新規のウイルス(データベースにデータがない)については無力であったことである。そこで我々は両手法の融合により未知のウイルスにも対応できる迅速、網羅的な解析方法を考案した。このような背景から熱帯地域において未知のウイルスを網羅的に同定し、その生態、診断法の研究・開発をおこなうことは世界の感染症対策に有用と考えられる。

2. 研究の目的

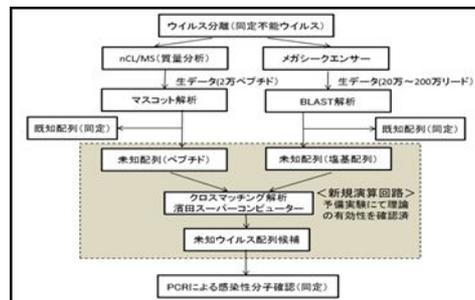
本研究は熱帯地域で蚊などの節足動物によって媒介される可能性のあるウイルスについて、我々が独自に実用化したプロテオミクスによるウイルス同定手法の情報とゲノミクスから得られる大量の遺伝子情報を比較

解析することで、1) 未知のウイルスを迅速に同定する手法を確立し、2) アジア・アフリカの熱帯地域で調査を実施して、ヒトに病原性を示す可能性のある蚊媒介性ウイルスを網羅的に同定し、3) その特異的診断法を創出して疾病の流行実態を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

熱帯地域の未知の蚊媒介性ウイルスを網羅的に明らかにするため、アフリカとアジアの研究拠点において、季節性発熱疾患(脳炎を含む)の流行期に患者から血液、髄液を、さらに環境中の媒介蚊個体を採取して、1) 蚊培養細胞や種々の哺乳類系培養細胞を用いてウイルス分離を実施する、2) 分離したウイルスは長崎大学熱帯医学研究所に搬送し、プロテオミクス(nCL/MS)解析とゲノミクス(パイロシーケンス)解析を実施する、3) これらの情報を既存のデータベースで検索して既知のデータと相同性の無いアミノ酸配列と塩基配列情報を抽出する、4) 濱田剛博士のスーパーコンピューターを用いて、アミノ酸配列と塩基配列情報の総当たり検索を行い未知ウイルス候補の配列を検出する、5) ウイルスの存在を確認したのち、当該ウイルスに特異的な遺伝子増幅検出法、抗体検出法を創出し、現地の保存患者血清を使って疫学解析を実施して、発見したウイルスの重要性について検証する、6) 以上の結果をまとめて熱帯地域における未知の蚊媒介性ウイルスを網羅的に明らかにする。

(図1) プロテオミクス、ゲノミクス融合解析による未知ウイルス同定の流れ)

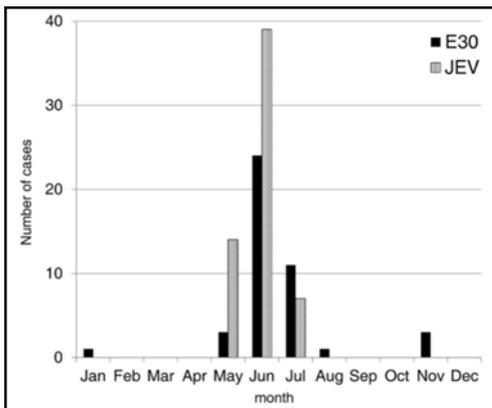


4. 研究成果

1) サンプルの採取と既知ウイルスの分離:

本研究を通して、当初計画のベトナム、フィリピン、ケニアに加えてミャンマー、ネパールなどの国々からも数千検体のサンプルが収集でき、現在も解析を継続している。分離された多くは既知のデングウイルス、チクングニアウイルス、エンテロウイルスなどであり、これらの情報は同地域で蔓延している蚊媒介性ウイルスの血清、および分子疫学（報告文献、2, 3, 4, 5, 6, さらには神経症状を呈したデングウイルスの中枢神経感染症例として報告し（報告文献7））現地の疾病対策上重要な情報となった。また、これまで臨床的に日本脳炎とされてきた症例の中に、エンテロウイルスによる髄膜炎が含まれていることが今回の網羅的な探索により明らかになった（図2）。これはこれまで想定外であった原因ウイルスが今回の網羅的な探索で初めて同定された成果である。

（図2）ベトナムにおける日本脳炎と原因不明であった脳炎の発生状況



2) 蚊サンプルからのウイルス分離状況

蚊のサンプルからは多くのウイルスが分離されており、既知、未知のウイルスを確認している。表1には蚊からのサンプルのプロテオミクス、ゲノミクスによる同定状況をしめしている。リフトバレーウイルスなどサンプル採取地域で当初から存在の想定されていたウイルスに加えて、既知ではあるが稀なウ

イルスである、エイラットウイルスなども容易に確認されている。これらの作業で同定不能であった、サンプルを新規手法での解析に供した。

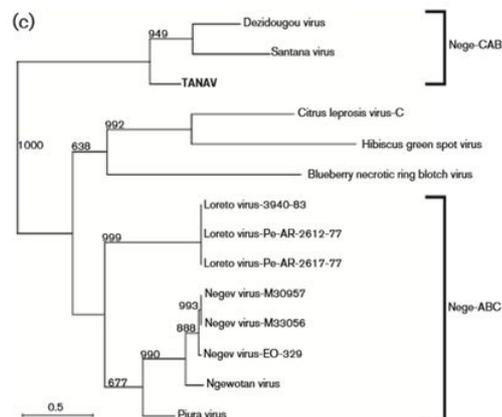
（表1：ケニアで蚊から分離されたウイルスのnLC-MSとNGSによる同定状況の一部）

| No. | Cell | Database | Taxonomy | Virus name | Protein name |
|-----|-------|------------|----------|--------------------------------------|------------------------|
| 1 | C6/36 | Swiss port | Virus | No match | |
| | | NCBI | Virus | No match | |
| 2 | Vero | Swiss port | Virus | Poko virus type 1 | genome polyprotein |
| | | NCBI | Virus | Fausto virus | endonuclease |
| 3 | Vero | Swiss port | Virus | feline sarcema virus | capsid protein |
| | | NCBI | Virus | Fausto virus | endonuclease |
| 4 | Vero | Swiss port | Virus | Poko virus type 1 | genome polyprotein |
| | | NCBI | Virus | No match | |
| 5 | Vero | Swiss port | Virus | Poko virus type 1 | genome polyprotein |
| | | NCBI | Virus | No match | |
| 6 | C6/36 | Swiss port | Virus | feline sarcema virus | unnamed protein |
| | | NCBI | Virus | feline sarcema virus | |
| | | | Virus | Venezuelan equine encephalitis virus | non structural protein |
| 7 | Vero | Swiss port | Virus | african horse sickness virus 9 | RNA polymerase |
| | | | Virus | Nipah Virus | Glycoprotein G |
| | | NCBI | Virus | naray mosaic virus | polyprotein |
| 8 | Vero | Swiss port | Virus | Rift valley fever virus | nucleoprotein |
| | | NCBI | Virus | Rift valley fever virus | nucleoprotein |
| 9 | C6/36 | Swiss port | Virus | Western equine encephalitis virus | structural protein |
| | | | | Sinbis virus | polyprotein |
| | | | | Rift valley fever virus | nucleoprotein |
| | | NCBI | Virus | Eilat virus | structural protein |
| | | | | Sinbis virus | polyprotein |
| | | | | Rift valley fever virus | nucleoprotein |
| 10 | C6/36 | Swiss port | Virus | feline sarcema virus | capsid protein |
| | | | | Poko virus type 1 | genome polyprotein |
| | | NCBI | Virus | feline sarcema virus | unnamed protein |
| | | | | Venezuelan equine encephalitis virus | non structural protein |

3) 新ウイルスの同定、

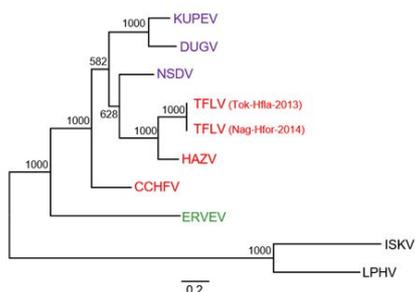
既知のデータベースに存在しないデータを用いて、ペプチド情報と塩基配列情報を総合的に評価するシステムにより新ウイルスの同定を続けている。フィリピンの蚊からはTanay ウイルス（文献業績8）、日本のダニからはTof1a ウイルス（文献業績）と命名したウイルスを発見した。ウイルスの全ゲノムを解析した結果、図3に示すようにTanay ウイルスは新規のネゲウイルスであることが判明した。

（図3）Tanay ウイルス(TANAV)遺伝子の解析結果



またトフラウイルス(TFLV)は全ゲノム解析から新規のナイロウイルス属に分類されるウイルスであることが判明した。

(図4) トフラウイルスの系統樹



(今後の展望)

直近のデータによると、自然界に存在するウイルスで既知のものは10%にも満たないと見積もられている。今後、地球の温暖化や熱帯地方の開発が促進されると、人類は未知の病原性ウイルスに遭遇する機会が増えるものと思われる。今後、今回開発した未知ウイルスの網羅的同定システムをさらに改良、活用して、熱帯地域を中心とした新規ウイルスの探索を継続して、将来の新興感染症ウイルスの出現に備える必要がある。

(参考文献)

1. Mesoniviridae: a new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. Arch Virol. 157(8):1623-8, 2012
2. Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing Evolutionary Link in the Emergence of the Largest RNA Virus Genomes. Nga et al. PLoS Pathogens 7: e1002215. 2011
3. Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. Okamoto et al. J. Virol. Meth. 167:31-36. 2010
4. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. Nakamura et al. Emerg. Infect. Dis. 14, 1784-1786, 2008

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 9 件)

- 1) Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Fuxun Y, Kurosaki Y, Shiogama K, Onouchi T, Sakaguchi M, Fuchigami T, Ono H, Nishi K, Posadas-Herrera G, Uchida L, Takamatsu Y, Yasuda J, Tsutsumi Y, Fujita H, Morita K, Hayasaka D, Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. Sci Rep. 11;6:20213, 2016 (doi: 10.1038/srep20213) 査読有
- 2) Phu Ly MH, Takamatsu Y, Nabeshima T, Pham Hoai LL, Pham Thi H, Dang Thi D, Nguyen NL, Nguyen Thi TT, Le Thi QM, Buerano CC, Morita K, Hasebe F. Isolation of dengue serotype 3 virus from the cerebrospinal fluid of an encephalitis patient in Hai Phong, Vietnam in 2013. J Clin Virol. 70:93-96. 2015 (doi: 10.1016/j.jcv.2015.07.295.) 査読有
- 3) Do LP, Bui TM, Hasebe F, Morita K, Phan NT. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in northern Vietnam, 1964-2011: genotype replacement. Virol J. 12:51. 2015 (doi: 10.1186/s12985-015-0278-4) 査読有
- 4) Pandey BD, Neupane B, Pandey K, Tun MM, Morita K. Detection of Chikungunya Virus in Nepal. Am J Trop Med Hyg. 93(4):697-700, 2015 (doi: 10.4269/ajtmh.15-0092.) 査読有
- 5) Kyaw Zin Thant, Mya Myat Ngwe Tun, Maria del Carmen Parquet, Shingo Inoue, Yee Yee Lwin, Sanda Lin, Kay Thi Aye, Pe Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Takeshi Nabeshima and Kouichi Morita.

- Molecular Epidemiology of Dengue Viruses Co-circulating in Upper Myanmar in 2006. *Tropical Medicine and Health* Vol. 43, 21-27, 2015、(doi: 10.2149/tmh.2014-27) 査読有
- 6) Yuki Takamatsu, Takeshi Nabeshima, Thuy Thi Thu Nguyen, Dinh Thi Dang, Ly Hoai Linh Pham, Hang Thi Pham, Lien Thi Nam Nguyen, Huong Ly Minh Phu, Thuy Thu Bui, Mai Thi Quynh Le, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. A Dengue virus serotype 4-dominated outbreak in central Vietnam, 2013. *Journal of Clinical Virology*. Vol.66, 24-26, 2015、(doi: 10.1016/j.jcv.2015.02.016) 査読有
- 7) Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Nabeshima T, Aoki K, Kyaw AK, Myint T, Tar T, Maung KTT, Hayasaka D, Morita K. Detection of East/Central/South African Genotype of Chikungunya Virus in Myanmar, 2010. *Emerg Infect Dis*. 20:1378-1381, 2014(doi: 10.3201/eid2008.131431) 査読有
- 8) Takeshi Nabeshima, Shingo Inoue, Kenta Okamoto, Guillermo Posadas-Herrera, Fuxun Yu, Leo Uchida, Akitoyo Ichinose, Miako Sakaguchi, Toshihiko Sunahara, Corazon C. Buerano, Florencio P. Tadena, Ildefonso B. Orbita, Filipinas F. Natividad, Kouichi Morita. Tanay virus, a new species of virus isolated from mosquitoes in the Philippines. *Journal of General Virology*, Vol.95:1390-5. 2014(doi: 10.1099/vir.0.061887-0.) 査読有
- 9) Yuki Takamatsu, Leo Uchida, Phan Thi Nga, Kenta Okamoto, Takeshi Nabeshima, Dang Thi Thu Thao, Do Thien Hai, Nguyen Thi Tuyet, Hoang Minh Duc, Le Xuan Luat, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. An approach for differentiating Echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam. *Virology Journal*. 10:280. 2013(doi : 10.1186/1743-422X-10-280) 査読有
- [学会発表](計 10件)
- 1) 嶋田聡, 青木康太郎, 鍋島武, 余福勲, 黒崎陽平, 塩竈和也, 尾之内高慶, 坂口美亜子, 淵上剛, 小野北斗, 西弘大, Guillermo Posadas-Herrera, 内田玲麻, 高松由基, 安田二郎, 堤寛, 藤田博己, 森田公一, 早坂大輔. 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス. 第50回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2015年5月15-16日. ホテル京都エミナース(京都府・京都市). (口頭)
- 2) 井上真吾, Caloline Wsonga, James Kimotho, 森田公一, Rosemary Sang, Lilian Musila. ケニアにおけるチクングニアの発生報告. 第50回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2015年5月15-16日. ホテル京都エミナース(京都府・京都市). (口頭)
- 3) 嶋田聡, 青木康太郎, 鍋島武, 余福勲, 黒崎陽平, 塩竈和也, 尾之内高慶, 坂口美亜子, 淵上剛, 小野北斗, 西弘大, Guillermo Posadas-Herrera, 内田玲麻, 高松由基, 安田二郎, 堤寛, 藤田博己, 森田公一, 早坂大輔. 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス. 第52回日本ウイルス学会九州支部総会. 2015年9月4-5日. 別府ビーコンプラザ中会議室(大分県・別府市). (口頭)
- 4) Satoshi Shimada, Kotaro Aoki, Takeshi Nabeshima, Yu Fuxun, Yohei Kurosaki, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi,

- Miako Sakaguchi, Posadas-Herrera Guillermo, Leo Uchida, Yuki Takamatsu, Jiro Yasuda, Yutaka Tsutsumi, Hiromi Fujita, Kouichi Morita, Daisuke Hayasaka. Tofla virus: a new Nairovirus belonging to the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 22-24 Nov 2015. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)(口頭)
- 5) Ngwe Tun Mya Myat, Kyaw Aung Kyaw, Nader Makki, Rohitha Muthugala, Takeshi Nabeshima, Shingo Inoue, Daisuke Hayasaka, Myat Thwe Saw Zin, Kouichi Morita. Dengue outbreak in Myanmar 2013: A decade persistence of predominant dengue virus serotype 1. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 22-24 Nov 2015. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)(口頭)
- 6) Nguyen Thi Thu Thuy, Yuki Takamatsu, Dang thi Dinh, Nguyen Nam Lien, Dang Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Bui Thu Thuy, Takeshi Nabeshima, Le Quynh Mai, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. A dengue virus serotype 4 dominant outbreak in central Vietnam, 2013. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 22-24 Nov 2015. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)(口頭)
- 7) 井上真吾, Allan ole Kwallah, Salame Ashur, Mulati Omuyundo, Missiani Ochwoto, Samson Muuo, Lucy Okubi, Matilu Mwau, 森田公一: ケニアインド洋沿岸におけるデング熱の発生報告, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2014 年 5 月 16 日~5 月 17 日ホテルニュー田中(山口県・山口市)(口頭)
- 8) 森田公一, わが国への侵入が危惧される
 フラビウイルス感染症、第 14 回ヒトと動物の共通感染症研究会学術集会、2014 年 11 月 8 日、国立感染症研究所(東京都・新宿区)(口頭)
- 9) 鍋島武, 井上真吾, 岡本健太, H. Guillermo Posadas, Yu Fuxun, F. Natividad Filipinas, 一瀬昭豊, 坂口美亜子, 砂原俊彦, 森田公一: 未知の蚊媒介性ウイルスを探索する。第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月 4 日~10 月 5 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)(ポスター)
- 10) 高松由基, 内田玲麻, Phan Thi Nga, 岡本健太, 鍋島武, Dang Thi Thu Thao, Do Thien Hai, Nguyen Thi Tuyet, 長谷部太, 森田公一: ベトナム国の急性髄膜炎/脳炎患者におけるエコーウイルス 30 感染例と日本脳炎ウイルス感染例の臨床比較解析。第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月 4 日~10 月 5 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)(ポスター)
- 〔図書〕(計 1 件)
森田公一. バイオセーフティ. 標準微生物学第 12 版(中込治, 神谷茂編集). p52-54. 医学書院. 2015
- 〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/virology/>
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 森田 公一 (MORITA, Kouichi)
 長崎大学・熱帯医学研究所・教授
 研究者番号: 40182240
- (2) 研究分担者
 長谷部 太 (HASEBE, Futoshi)
 長崎大学・国際連携研究戦略本部・教授
 研究者番号: 20253693
 井上 真吾 (INOUE, Shingo)
 長崎大学・熱帯医学研究所・助教
 研究者番号: 00346925
- (3) 連携研究者
 余 福勲 (YU, Fuxun)
 長崎大学・熱帯医学研究所・助教
 研究者番号: 30437842