

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870524

研究課題名(和文) 日本脳炎ウイルスの系統地理学

研究課題名(英文) Phylogeography of Japanese encephalitis virus

研究代表者

鍋島 武 (NABESHIMA, Takeshi)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：30546859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：2013年は8月に長崎県五島市富江町の豚舎周辺、また対馬市上県町佐護の水田周辺及び厩舎周辺で、また2014年は8月に五島市富江町、9月に鹿児島県奄美市秋名の水田地区で、二酸化炭素を誘引剤としたトラップ、紫外線を用いたトラップ、吸虫管を用いた蚊の採集を行った。2013年に五島市で採集された蚊から分離された2系統の日本脳炎ウイルスは遺伝子型1、サブクラスター2に属していた。奄美市で採集された蚊の遺伝子型からは、蚊が琉球列島を伝って南方より移動している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In August of 2013, we conducted mosquito collection in Goto city Tomie-cho, Nagasaki prefecture, and Kamiagatamachisago, Tsushima-shi, Nagasaki prefecture with using the carbon dioxide trap, UV light trap and aspirators. In 2014, we collected mosquitoes in August, in Goto city Tomie-cho, and in September, in a rice paddy area in Kagoshima-ken Amami city, Akina area. Two strains of Japanese encephalitis viruses were separated from mosquito which collected at Goto city, and they are belonged to genotype 1, sub-cluster 2. And from the genotype of mosquitoes which collected in Amami city, it is implied that, the vector mosquitoes are migrating between southeast Asia to Japan along with the Ryukyu archipelago.

研究分野：ウイルス学

キーワード：日本脳炎ウイルス コガタアカイエカ

1. 研究開始当初の背景

我々がこれまでに行った研究により、日本脳炎ウイルスは、中国大陸、東南アジアから、頻繁に日本に侵入していることが明らかになった。また、近年、西ナイルウイルス、チクングニアウイルス等、吸血性昆虫の媒介するウイルスが近年急速に分布を広げ、世界的に問題となっている。また、しかし、このようなウイルスの大陸間の移動のメカニズムについては、未だ未知の部分が多い。

日本脳炎ウイルスは鳥類や豚の体内で増幅され、Culex 属の蚊により媒介される。大陸間を移動する渡り鳥や、風に乗って運ばれた蚊が、ウイルスを日本にもたらしている可能性がある。過去に、太平洋上の観測船において、風に吹き飛ばされた Culex 属の蚊が捕獲されたという報告があり、また、セジロウカ等の農業害虫については、中国大陸、東南アジアから毎年、季節風に乗って、日本に飛来していることが明らかになっている。

本研究所では、1960年代から現在に至るまで長期にわたり、蚊からのウイルスの採集を行ってきており、それら過去に分離されたウイルス株を保有している。これまでに分離された日本脳炎ウイルス、およびウイルスを運ぶ蚊の遺伝子型の経時的な変遷を、系統地理学的手法を用いて解析することにより、日本脳炎ウイルスの日本への侵入のメカニズムについて明らかにすることが可能となる。

これまでに本研究所において分離した日本脳炎ウイルス株の遺伝子型、また過去に採集した蚊のゲノム中からマーカーとなる遺伝子の配列を解読して、公開データベース上のデータと系統地理学的手法による比較を行い、1960年代から現在に至るまでの、過去のアジアにおける日本脳炎ウイルス、および媒介蚊の遺伝子集団の分布の、経時的な変遷を明らかにすることを目的とした。

将来起こりうる、ウイルスの感染拡大に備えるために、ウイルス、また媒介者となる節足動物の分布、移動、生態を分析し、ウイルスの分布域拡大、新しい土地への侵入のメカニズムについて解明することが本研究の目的である。本研究での成果として、日本脳炎ウイルス、およびそれを媒介する昆虫の遺伝子集団の分布の変遷が明らかになれば、本研究所において過去にベトナムのサンプルから分離された Banna virus や、近年日本では報告されていないが、大韓民国で発生したという報告のあるマラリア、近年、Culex 属の蚊から発見された Omono River virus や Mesoniviridae の Nam

Dihn virus 等、将来日本に侵入する可能性のある、他の昆虫媒介性の病原性微生物の生態の研究へと応用し、将来のアジアにおける新興感染症の発生に備えるための研究が可能となる。

2. 研究の目的

社会の国際化、温暖化等地球環境の変化に伴い、海外から新たに日本に伝染病の病原体が侵入する恐れが高まってきている。本研究では、日本脳炎ウイルスと、ウイルスを媒介する Culex 属の蚊について、遺伝子集団の分布を調査し、中国、東南アジアで単離されたウイルスと比較することにより、日本脳炎ウイルスが日本に侵入するメカニズムを解明することを目的とする。本研究の結果から、新たに日本に侵入する可能性の有る、吸血性昆虫媒介性の病原体について、早期の対策を立てることが可能になる。

3. 研究の方法

長崎県(九州本土、五島列島、対馬)で Culex 属の蚊の採集を行う。

蚊の頭部より蚊の核ゲノム DNA、ミトコンドリアゲノム DNA を抽出し、蚊の腹部より日本脳炎ウイルスを分離する。

蚊の遺伝子、日本脳炎ウイルスのゲノム RNA の塩基配列を解読し、公開データベース上に登録された他の系統と比較して、日本脳炎ウイルス、および媒介蚊の遺伝子集団の移動について、系統地理学的手法を解析を行う。

4. 研究成果

研究計画に基づき、2013年8月17日から19日に長崎県五島市富江町の豚舎周辺で、二酸化炭素を誘引剤としたトラップ、紫外線を用いたトラップで蚊の採集を行った。五島市では2580頭の蚊を採集し、そのうち1600頭が日本脳炎ウイルスの媒介ベクターとして重要なコガタアカイエカであった。その後2013年8月28日から30日に対馬市上県町佐護の水田周辺、また厩舎周辺で、同じくトラップ、また吸血管を使用して蚊の採集を行った。対馬市では採集された2472頭の蚊のうち、1772頭がコガタアカイエカであった。

2014年には8月24日から26日にかけて五島市富江町で蚊の採集を行い、2809頭のコガタアカイエカを採集した。

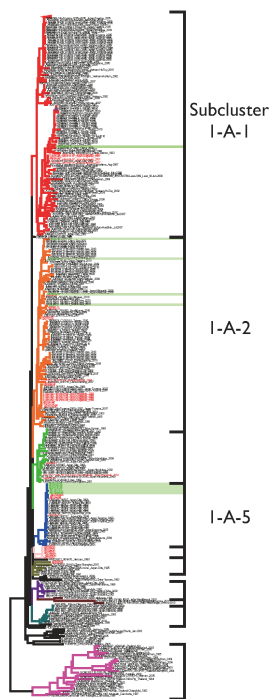
2014年には全国的にブタ流行性下痢症が発生し、豚舎周辺での蚊の採集が困難となったため、蚊の遺伝子型の調査のために9月24日から26日にかけて鹿児島県奄美市秋名地区の水田地で蚊の採集を行い、40頭のコガタアカイエカを採集した。

採集されたコガタアカイエカを10頭ごとにプールに分け、ホモジナイズして遠心し、上清を c6/36 細胞に接種して 27 度で培養の後、上清を回収した。

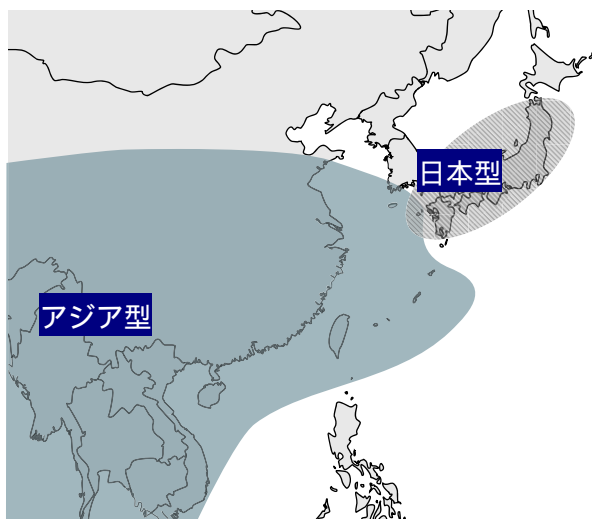
この培養上清中に、蚊由来の日本脳炎ウイルスが含まれているかを確認するため RT-PCRを行った。五島市で採集された蚊からは新しく2系統の日本脳炎ウイルスの分離に成功した。

回収された日本脳炎ウイルスのゲノムのうち、Eタンパクをコードしている領域をRT-PCRで増幅し、その塩基配列を解読した。その配列をデータベース上で公開されている、機知の日本脳炎ウイルスの塩基配列情報と比較したところ、五島市で新しく分離された日本脳炎ウイルスは遺伝子型1、サブクラスター-2に属しており、2010年以降五島市に生息している日本脳炎ウイルスに系統的に近縁であることが示唆された。

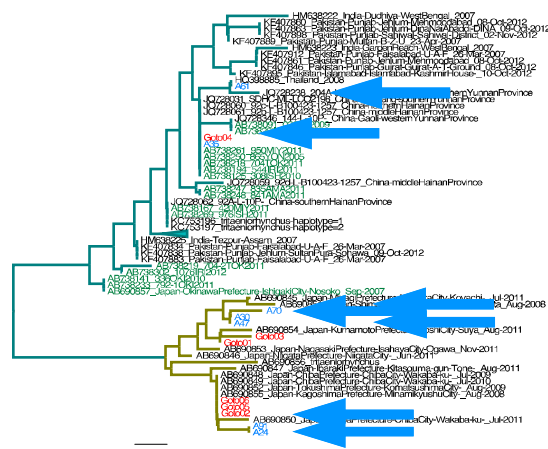
日本脳炎ウイルスの主要なベクターであるコガタアカイエカは、日本固有の遺伝子型集団と、アジア大陸、台湾、沖縄に固有の集団に別れる事が近年明らかになってきた。奄美市で採集されたコガタアカイエカはの遺伝子型からは、奄美大島では両方の遺伝子型の集団が混在している事が明らかになり、琉球列島を通してコガタアカイエカが移動している可能性が示唆された。



Eタンパクコーディング領域の塩基配列に基づく日本脳炎ウイルスの系統樹
五島列島で分離された株を網掛けで表示
2013年の株は1-A-2群に所属



コガタアカイエカの2つの遺伝子集団の分布



ミトコンドリア COI 遺伝子に基づくコガタアカイエカの系統樹
石垣島で採集された株を矢印で表示
上のクラスターが大陸型、下のクラスターが日本固有型

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)
第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会
発表者 鍋島 武
表題 長崎県対馬と五島列島における蚊の採集とJEVの分離
2014年 5月18日
山口県山口市 ホテル防長苑

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋島 武 (NABESHIMA, Takeshi)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：30546859