

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893151

研究課題名(和文) マダニ由来培養細胞株の樹立ならびにマダニ類が保有するウイルスの網羅的探索

研究課題名(英文) Establishment of tick cell line and survey for tick-borne viruses in Japan

研究代表者

鎌田 龍星 (Kuwata, Ryusei)

山口大学・理工学研究科・研究員

研究者番号：00711219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(1)本邦マダニ由来の細胞株樹立の試みと(2)本邦マダニが保有・媒介するウイルスの網羅的探索を行った。

(1)タカサゴキラマダニ体内組織をVP-12培地(FBS15%TPB15%添加)で培養した実験区において、一部、細胞分化の誘導が認められた。現在、細胞接着能のより高い培養容器を用いて、同条件下での培養を再度試みている。

(2)山口県を中心に、国内で旗振り法または野生動物に寄生しているマダニを採集し、ウイルス保有状況を調査した。その結果、これまで日本で報告の無いウイルスの遺伝子を検出することに成功した。これらの発見に関して、現在、詳細な解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, I conducted to establish of tick cell line and survey for tick-borne viruses in Japan.

I temporary cultured of the cells from the tissue of Amblyomma testudinarium in VP-12 medium with 15% FBS and 15% TPB. However, these cells were flowed because of the weak attachment to the bottom of culture dish. Now I tried to culture again with the same condition on ploy-L-lysine-coated dishes.

We collected ticks at several sites of Japan, mainly Yamaguchi prefecture, by tick flagging technique or ticks parasitizing the wild animals. Collected ticks were identified and used for virus isolation or detection of viral gene. As a result, we successfully detected viral genes of undescribed species from RNA extraction of ticks collected in several place of Japan. Now we analyzed the characteristics of these virus species.

研究分野：衛生動物学

キーワード：マダニ 培養細胞 ウイルス 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

蚊やマダニなどの節足動物は、動物を吸血する際にウイルスや細菌などの病原体を媒介する、公衆衛生上の重要な衛生害虫である。我々は、地球温暖化や生態系の攪乱などによって生じる環境変化に伴う、節足動物媒介感染症の感染リスクの変化に対して、臨機応変に対応しなければならない。そのためには、これら媒介節足動物の病原体に対する生物学的特性や感染状況を把握することは、予防衛生上、極めて重要である。

## 2. 研究の目的

本邦マダニ類が保有・媒介するウイルスに関する知見は限られている。その一因として、ウイルスの分離作業や感染機序を研究するためのツールとして有用な本邦マダニ由来の培養細胞株が存在しないことが挙げられる。そこで本研究では、(1) 本邦マダニ由来の培養細胞株樹立の試みと、(2) 本邦マダニ類が保有・媒介するウイルスの網羅的探索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 本邦マダニ由来培養細胞株樹立の試み

本邦マダニ類のうち、主に人畜への刺咬例が多いマダニ種(カサゴキラマダニ、タイワカマダニ、フタゲマダニ、キマダニ等)を用いて初代培養を試みた。組織片には、表面殺菌した産下卵、新生幼マダニ、成マダニを解剖して得た体内組織を用いた。また、卵や成マダニの表面殺菌には、塩化ベンザルコニウム液、70%エタノール、ポビドンヨード液を用い、細胞へのダメージが少なく且つ十分な殺菌効果が得られる条件を検討した。

培養液には、蚊やマダニの組織培養で実績のある数種類の基礎培地(グレース培地、シュナイダー培地、MM培地、VP-12培地、L-15培地)に、ウシ胎児血清(FBS)や Tryptose Phosphate Broth (TPB) の添加物、抗生物質を様々な濃度で組み合わせて用いた。

### (2) 本邦マダニが保有・媒介するウイルスの網羅的探索

山口県を中心に、国内数地点で旗振り法または野生動物に寄生しているマダニを採集した。採集マダニは生かしたまま実験室へ持ち帰り、形態情報に基づいて種の同定を行った。種が確定したマダニは、1~20個体を1プールとし、超低温槽(-80℃)に保管した。

保管したマダニより乳剤を調整し、培養細胞を用いたウイルス分離または RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 本邦マダニ由来培養細胞株樹立の試み

マダニ産下卵または成マダニの表面殺菌の条件として、10%塩化ベンザルコニウム液で5~10分間、丁寧に表面殺菌して流水で濯いだ後、1%ポビドンヨード液を加えた70%エタノールで10~15分間、丁寧に表面殺菌して流水で濯いだものを用いることにより、雑菌の混入が見られないマダニ生細胞の維持が可能となった。

また、前記で示した様々な培養条件のうち、組織片をタカサゴキラマダニ成虫の体内組織、培地を VP-12 (FBS 15%、TPB 15%) とした実験区において、一部、細胞分化の誘導が認められた(図1)。しかし、これらの分裂細胞は培養容器底面との接着が弱かったために浮遊し、その後、分裂は停滞した。

現在、細胞接着能のより高い培養容器を用いて、同条件下での培養を再度試みている。

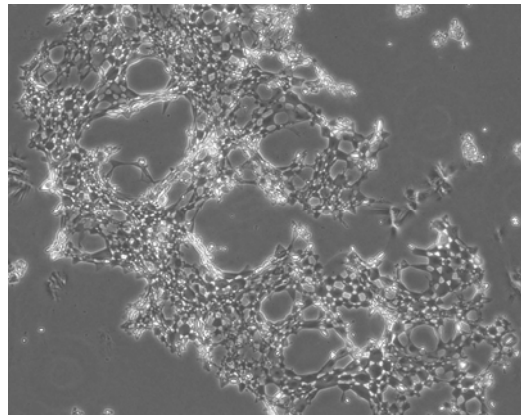


図1. 細胞分化の誘導が認められた像

### (2) 本邦マダニが保有・媒介するウイルスの網羅的探索

旗振り法または野生動物に寄生しているマダニを採集し、培養細胞を用いたウイルス分離または RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出を試みた。ウイルス分離に関しては、研究期間内に安定したマダニ由来の細胞株が得られなかったことから、哺乳動物由来の培養細胞を用いた。

山口県を中心に国内で採集したマダニについてウイルス保有状況を調査した。その結果、ウイルスの分離または遺伝子を検出することに成功した。

①兵庫県西宮市で捕集されたアカコッコマダニ *Ixodes turdus* よりウイルスを分離した。ウイルス培養上清の遺伝子解析を行った結果、本ウイルス分離株は10分節の二本鎖 RNA をゲノムに持ち、マダニ媒介性オルビウイルスの一種である Tribec virus と近縁である

ことが判明した (図 2a)。培養上清から本ウイルスを精製し、電子顕微鏡観察を行った結果、直径約 80nm の球状正二十面体を示すウイルス様構造物が認められた (図 2b)。

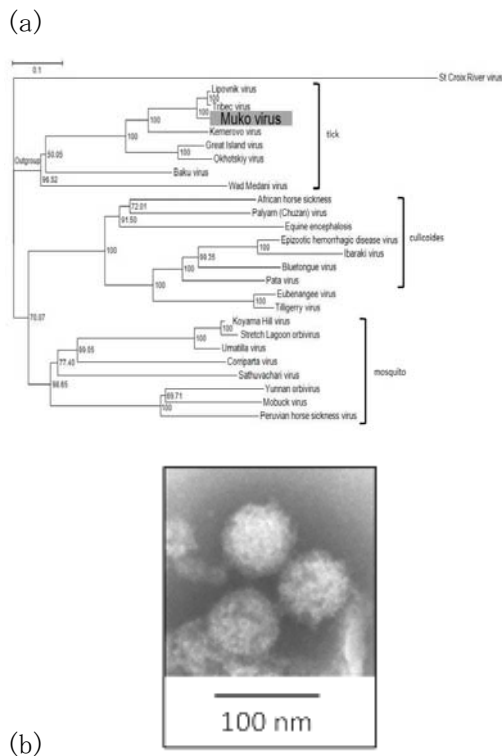


図 2. 本邦アカコッコマダニ由来ウイルスの分子系統解析 (a) と粒子像 (b)

②山口県下関市で捕獲された野生動物 (イノシシ・シカ) またはマダニのウイルス保有状況を調査した結果、イノシシの肝臓またはマダニからフラビウイルス遺伝子が検出された。また、シカからは日本脳炎ウイルスの遺伝子が検出された (図 3)。イノシシおよびマダニから検出されたウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行った結果、本ウイルス遺伝子はこれまでに報告の無い未知のフラビウイルス遺伝子であることが判明した (図 3)。

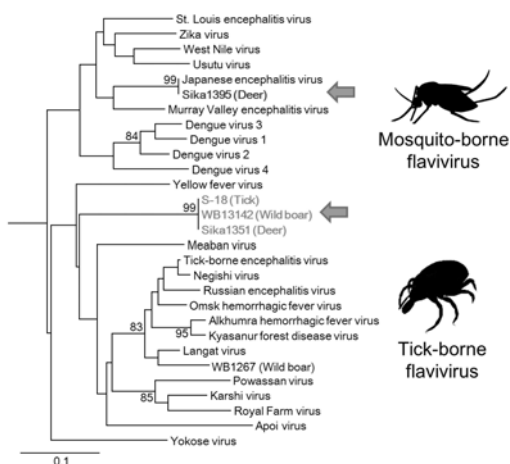


図 3. 野生動物およびマダニから検出されたフラビウイルス遺伝子の系統解析。矢印は本研究によって得られた遺伝子を示す。

その他、未同定のウイルス分離株が複数得られている。これら本邦マダニ由来ウイルスに関する発見について、引き続き詳細な解析を行ってゆく。

### 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 4 件)

1. 濱崎千菜美, 鯨田龍星, 下田宙, 前田健 (2015) マダニ媒介性重症熱性血小板減少症候群の現状と対策. *Avant* (メリアルジャパン株式会社発行): 31, 2-5. (査読無)
2. 米満研三, 寺田豊, 鯨田龍星, 下田宙, 高野愛, 前田健 (2014) 野生動物を介した人獣共通感染症について. *獣医公衆衛生研究*: 17(2), 17-21. (査読無)
3. 濱崎千菜美, 米満研三, 高野愛, 鯨田龍星, 下田宙, 前田健 (2014) SFTS ウイルス検出状況と重症熱性血小板減少症候群について. *生活と環境* (一般財団法人日本環境衛生センター発行): 699, 11-17. (査読無)
4. 鯨田龍星, 高野愛, 下田宙, 前田健 (2013) マダニ類が保有・媒介するウイルス感染症. *獣医寄生虫学会誌*: 12(1), 32-43. (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

1. 前田健, 濱崎千菜美, 下田宙, 鯨田龍星, 他 5 名. SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性. 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)
2. 米満研三, 下田宙, 鯨田龍星, 寺田豊, 高野愛, 前田健. 野生動物・ダニからフラビウイルス遺伝子検出. 第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 2014 年 11 月 9 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
3. 下田宙, 米満研三, 早坂大輔, 好井健太郎, 寺田豊, 野口慧多, 鯨田龍星, 高野愛, 前田健. 国内の野生動物およびダニから新規フラビウイルスの検出. 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 (北海道札幌市)
4. 濱崎千菜美, 鯨田龍星, 他 7 名. 野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査. 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 (北海道札幌市)
5. 江尻寛子, 鯨田龍星, 他 12 名. 国内捕集蚊およびマダニ由来のオルビウイルス. 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 (北海道札幌市)

6. 濱崎千菜美, 鯨田龍星, 他 7 名. 野生動物における SFTS ウイルス感染の拡大傾向. 第 29 回中国四国ウイルス研究会. 2014 年 6 月 28~29 日. 山口大学 (山口県山口市)
7. 沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 鯨田龍星, 前田健, 他 4 名. マダニ相に関する国内調査. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2014 年 5 月 16~17 日. ホテルニュータナカ (山口県山口市)
8. 江尻寛子, 鯨田龍星, 他 8 名. 国内で捕集された蚊およびマダニから分離されたオルビウイルスの性状解析. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2014 年 5 月 16~17 日. ホテルニュータナカ (山口県山口市)
9. 濱崎千菜美, 鯨田龍星, 他 7 名. 野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2014 年 5 月 16~17 日. ホテルニュータナカ (山口県山口市)

〔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〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鯨田 龍星 (KUWATA, Ryusei)  
山口大学・理工学研究科・学術研究員  
研究者番号 : 00711219