

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07715

研究課題名(和文)蚊媒介性ウイルスの網羅的検査法および迅速検査法の開発

研究課題名(英文)Comprehensive detection methods for mosquito-borne viruses

研究代表者

大場 靖子(OBA, YASUKO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・講師

研究者番号：60507169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルボウイルス感染症の迅速な診断法の確立、及び媒介蚊からウイルスを効率的に検出する方法を確立することを目的として実施した。主要なアルボウイルス種を広範囲に検出可能な one-step RT-PCR法による遺伝子検査系を確立し、この方法を用いてザンビアに生息する蚊のスクリーニングを実施し、多数の蚊媒介性ウイルスを検出した。ヒト検体のアルボウイルス遺伝子検査にも確立した検査法を応用した。また、蚊から抽出したRNAから、フラビウイルス、ブニヤウイルス、二本鎖RNAウイルス等を次世代シーケンサーで効率的に検出する方法を考案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したアルボウイルスの遺伝子検査系を用いて、感染症の先回り対策として、アフリカのザンビア共和国において蚊におけるアルボウイルスのスクリーニングを実施した。その結果、ザンビアで初めてウエストナイルウイルスを検出し、临床上重要なアルボウイルスの存在を明らかにした。ザンビアではヒトでのウエストナイル熱を含むアルボウイルス感染症発生の報告がないことから、この結果をザンビアの保健省等に報告し、感染症流行予防の対策を講じる上で重要な成果となった。熱性疾患の患者由来検体のアルボウイルス遺伝子検査にも確立した方法を応用した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify arboviruses in mosquitoes, we have established the one-step RT-PCR methods to detect broad arboviruses by using degenerated primers against flaviviruses, alphaviruses, phleboviruses respectively. Using these comprehensive methods, we have identified many mosquito-borne viruses including previously unidentified viruses and West Nile virus from field-collected mosquitoes in Zambia. These methods were applied to the detection of arboviruses in samples from febrile human cases in Zambia. Our results using established methods provide the first evidence of the circulation of West Nile virus in Zambia and suggest there should be an increased awareness of possible associated human and animal diseases in that country.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染症 蚊媒介性ウイルス アルボウイルス 診断法

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスやチクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルスによる感染症は、媒介蚊の生息域の拡大に伴い世界的に発生地域が拡大し感染者数が急速に増加している。新たな地域へのウイルス侵入を監視し、感染症流行の先回り対策を行うためには、媒介動物となる蚊におけるウイルス感染の調査が重要である。

蚊検体を用いたウイルスの検索は、多検体に対し多種類の蚊媒介性ウイルスを解析する必要があり、従来実施してきた個々のウイルスに対する遺伝子増幅や、細胞接種による長期間の継代法が効率的ではない。また、標的ウイルス遺伝子配列以外のウイルス株や新規のウイルスの検出に対応できていない可能性がある。その為、多検体の蚊サンプルにも対応出来る効率的かつ網羅的な蚊媒介性ウイルスの検出法を確立することを目的とし、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究計画では、人獣共通感染症の原因となる蚊媒介性ウイルスを媒介蚊から効率的に検出する方法を確立するとともに、流行が懸念される地域において媒介蚊および動物やヒト検体での迅速で容易な検査法として確立し普及させることを目的とする。

(1) 蚊媒介性ウイルスの核酸を網羅的に検出するため、各ウイルス属内のウイルスを広範囲に検出し得る RT-PCR 法を確立する。

(2) 蚊から多種のウイルス粒子もしくはウイルスタンパク質を高感度に検出する系を確立する。

(3) (1)、(2)により確立した方法を用いて、アルボウイルス感染症流行が懸念される現地において、蚊での調査に加えて、ヒトや動物検体におけるウイルス検査法としての応用を試みる。

3. 研究の方法

(1) 蚊媒介性ウイルスの核酸を網羅的に検出。

蚊媒介性ウイルスの遺伝子を広範囲に検出するために、主要なアルボウイルスであるフラビウイルス属、ブニヤウイルス目、アルファウイルス属それぞれに属するウイルスに関して、遺伝子配列が比較的保存されている領域に対する共通プライマーを設計し、既知ウイルス遺伝子の検出感度を基に one-step RT-PCR 法の至適条件を検討した。フラビウイルス属を検出する共通プライマーは既報の配列を参考に作製し条件決定を行った。また、蚊から抽出した total RNA には PCR 阻害物質が含まれることから、蚊由来 RNA 存在下での至適条件を検討した。また、既報のウイルス特異的 real-time RT-PCR アッセイ系 (Zika virus, yellow fever virus, West Nile virus) がアフリカ由来のウイルス株にも対応するように条件検討またはプライマー、プローブを新たに設計すると共に、マルチプレックスアッセイ系を検討した。

(2) 蚊から多種のウイルス粒子もしくはウイルスタンパク質を高感度に検出する系を確立。

研究開始当初は、ウイルス粒子やタンパク質を特異抗体を用いて検出する系を検討したが、フラビウイルスは種間での抗体交差性が高いことや、未知ウイルスの同定が難しいことから、蚊から抽出した total RNA を用いて次世代シーケンサーで網羅的に RNA ウイルスゲノムを検出するために、蚊の RNA から効率的にウイルスゲノムを濃縮する方法を検討した。

(3) アルボウイルス感染症流行が懸念される現地において、蚊での調査に加えて、ヒトや動物検体におけるウイルス検査法としての応用を試みる。

(1) で確立したフラビウイルス、フレボウイルス、アルファウイルスを広範囲に検出する各種 one-step RT-PCR 法を用いて、アフリカのザンビアで採集した野外生息蚊から RNA を抽出し、ウイルススクリーニングを実施した。検出したウイルスはウイルス分離、ゲノム全長の同定を試みた。シーケンサーにより得られたウイルス遺伝子情報を基に系統樹解析を実施した。ザンビア国内での熱性疾患患者から得られた血清検体を用いて、RNA を抽出し、上記の広範囲なアルボウイルス遺伝子検査に加えて、これまでに構築したウイルス特異的 real-time RT-PCR アッセイ系を用いてアルボウイルス検査を実施した。

4. 研究成果

・フラビウイルス属の検出

既報の pan-Flavivirus qRT-PCR のプライマー (Patel P. et al. *Virology* 2013) を conventional one-step RT-PCR 法に応用した系を用いて、H30 年度までにザンビアで採集した雌蚊のスクリーニングを実施した。その結果、ザンビアで採集したネットアイエカの 1 プールから West Nile virus (WNV) の遺伝子を検出した。ウイルス陽性の蚊プールのホモジネートを用いて培養細胞によるウイルス分離を試みた結果、WNV が単離された。次世代シーケン

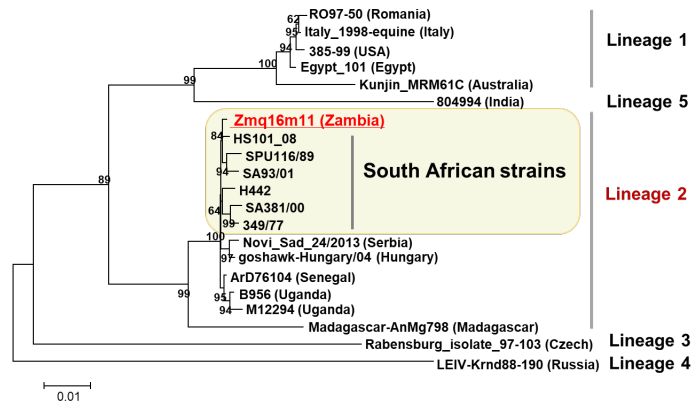


図1 ウエストナイルウイルス全長アミノ酸の系統樹解析

サーおよび RACE 法によりウイルス全長を同定し、系統樹解析を行った結果、南アフリカにおいて脳炎患者から検出されている Linage 2 の West Nile virus strains に近縁の新規株 (図 1. strain Zmq16m11) であることが判明した (発表論文)。また、イエカ属の蚊から Barkedji virus (BJV) および新規フラビウイルスとなる Barkedji-like virus を検出した。BJV はこれまでに蚊以外の動物への感染は報告されておらず、各種哺乳動物細胞での増殖が確認されなかったことから、蚊特異的ウイルスと考えられた。

また、リアルタイム RT-PCR を用いた Zika virus (ZIKV) の検出にあたり、現在多くの検査機関で使用されている検出系では、ZIKV アジア系統 (アジア、西太平洋地域、アメリカ大陸で流行) に比較してアフリカ系統の増幅効率が顕著に低いことが判明したことから、各株の配列に共通な部位に新たにプライマーとプローブを設計した。その結果、アジア系統 (FSS) およびアフリカ系統の 2 株 (MR-766, DaKAR) で同等の検出感度で検出可能であり、世界各地での ZIKV サーベイランスに有用と考えられた。

・ブニヤウイルス目の検出

フレボウイルス L 遺伝子の種間で相同性が高い領域に対して共通プライマーを設計し、one-step RT-PCR 法により、Rift Valley fever virus, severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, sandfly fever Naples virus, Forecariah virus のゲノム RNA を用いて至適条件を決定した。Rift Valley fever virus は蚊由来 RNA 存在下でも反応液中約 20 コピーのウイルス RNA の検出が可能であった。この方法を用いて、H30 年度までにザンビアで採集した雌蚊のスクリーニングを実施した。その結果、ザンビア各地の蚊から蚊特異的と考えられる多種の新規ブニヤウイルスを検出した。

・アルファウイルス属の検出

アルファウイルス属の種間で相同性の高い nsP4 遺伝子領域に対して共通プライマーを設計し、chikungunya virus, sindbis virus のゲノム RNA を用いて、one-step RT-PCR 法による増幅の至適条件を決定した。確立した系を用いて、H30 年度までにザンビアで採集した雌蚊のスクリーニングを実施した。その結果、新規アルファウイルスとなる

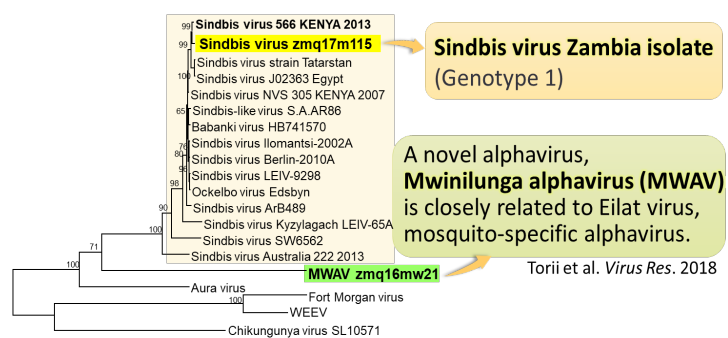


図2 アルファウイルス 非構造タンパク質の系統樹解析

Mwinilunga alphavirus を同定した (発表論文)。また、アルボウイルスである sindbis virus をザンビアにおいて初めて同定した (図 2)。

・RNase R 処理によるウイルスゲノムの効率的な検出方法の開発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

蚊から遺伝子情報が不明な新規ウイルスを同定するために、蚊由来 total RNA からフラビウイルス、ブニヤウイルス、二本鎖 RNA ウィルス等の RNA ウィルスゲノムを濃縮し、次世代シークエンサーで効率的に検出する方法を検討した。フラビウイルスゲノムは 3' UTR に高次構造を持ち、ブニヤウイルスは 3 分節の末端がパンハンドル構造を持っている。RNase R は、このように RNA の 3' 末端が二本鎖の場合は分解せず、ポリ A を持つ RNA を含む一本鎖 RNA を分解する。この酵素で蚊から抽出した Total RNA を処理し、残存した RNA からライブラリーを作製して MiSeq にて解析した。得られたリードをアセンブリしウイルスゲノムを Blast 検索した結果、RNase R 処理のサンプルでは、処理なしのサンプルと比較し、フラビウイルス、ブニヤウイルス、2 本鎖 RNA ウィルスなどのウイルスゲノムのリード数が増加した (図 3)。

この結果から、RNA ゲノムの末端が 2 本鎖を形成するウイルスでは、RNase R 処理により宿主 RNA 由来の一本鎖 RNA を分解することで、ウイルスゲノムの検出感度が増加することが明らかとなった。この方法を用いて、これまでに多様なブニヤウイルス、フラビウイルス、二本鎖 RNA ウィルスの新規ウイルスゲノムを効率的に同定した。

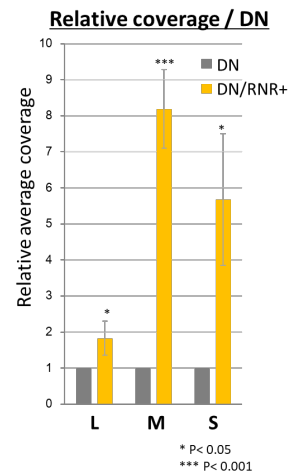


図3 RNase R (RNR) 処理サンプル中のブニヤウイルスゲノム(L, M, S segment)に対するリード数の Average coverage

・熱性疾患患者検体のスクリーニング

上記の研究によりを用いてウエストナイルウイルス(WNV)をザンビアにおいて初めて検出したことから、ザンビア国内での熱性疾患患者から得られた血清検体を用いて、RNA を抽出し、本検査法に用いた広範囲なアルボウイルス遺伝子検査に加えて、これまでに構築したウイルス特異的 real-time RT-PCR アッセイ系 (Zika virus, Yellow fever virus, West Nile virus) を用いてアルボウイルス検査を実施した。約 1,000 検体の血清から抽出した RNA を調査した結果、上記のアルボウイルス遺伝子は検出されなかった。この研究は、ザンビアならびに北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターでの倫理審査承認 (承認番号: 人獣 30-5) を得て実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Orba Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Wada Y, Anindita PD, Phongphaew W, Qiu Y, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Eto Y, Sasaki M, Hall WW, Eshita Y, Sawa H. First isolation of West Nile virus in Zambia from mosquitoes. *Transbound Emerg Dis.* 2018, 65(4):933-938. doi: 10.1111/tbed.12888. 査読有

Torii S, Orba Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Wada Y, Anindita PD, Phongphaew W, Qiu Y, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Eto Y, Harima H, Sasaki M, Carr M, Hall WW, Eshita Y, Abe T, Sawa H. Discovery of Mwinilunga alphavirus: A novel alphavirus in *Culex* mosquitoes in Zambia. *Virus Res.* 2018, 2;250:31-36. doi:10.1016/j.virusres.2018.04.005. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

大場 靖子、First evidence of West Nile virus circulation in Zambia. 第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

大場 靖子、Evidence of West Nile virus circulation in Zambia. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年

大場 靖子、蚊に潜むウイルス LOVE LABO 2018、2018 年

大場 靖子、An RNA virus enrichment approach for viral metagenomics using Ribonuclease R ConBio2017、2017 年

大場 靖子、Discovery of diverse mosquito-borne bunyaviruses in field-collected mosquitoes. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年

大場 靖子、人獣共通感染症-蚊・野生動物が運ぶウイルス- 土曜市民セミナー・北大の研究最前線、2016 年

大場 靖子、Identification of a mosquito-borne Orbivirus in Zambia. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

〔図書〕(計 3件)

澤 洋文、江下 優樹、大場 靖子、日本医事新報社、リフトバレー熱 フレボウイルス感染症「グローバル時代のウイルス感染症」、296 (pp101-105) 2019年

上村 清、江下 優樹、大場 靖子 他9名、朝倉書店、蚊のはなし - 病気との関わり -、148 (pp82-97) 2017年

佐々木 道仁、大場 靖子、澤 洋文、最新医学社、野生動物が保有するウイルスを対象とする研究、72 巻 4 号「One Health の視点からみた感染症の現状と対策」最新医学、168 (pp 508-512) 2017年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/pathobiol/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。