

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24246

研究課題名(和文) 節足動物媒介性オルソブニヤウイルス検出系の確立と野生動物における感染状況の調査

研究課題名(英文) Establishment of detection system for arthropod-borne orthobunya virus and surveillance in wild animals.

研究代表者

河原 円香 (Kawahara, Madoka)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員

研究者番号：80847559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：オルソブニヤウイルスは世界各地に広く分布し、ヒトに熱性疾患や脳炎を引き起こす人獣共通感染症の原因となっている。そのうちの一つであるオロプーシュウイルスは南米において多くの感染者が報告されている。本研究では日本国内の野生動物についてオロプーシュウイルスの血清学調査を行った。その結果、国内の野生動物にはすでにオロプーシュウイルスの感染が広がっていることが示された。本研究の結果から、ヒトに感染性を持つオルソブニヤウイルス感染症の国内発生のリスクが高まっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オロプーシュウイルス感染者が報告されているブラジルやペルー等の南米地域では、オロプーシュウイルス感染は節足動物媒介による野生動物間の森林サイクルと、ヒト間の都市サイクルの双方が感染経路として考えられている。本研究課題によって国内に未検出であり人獣共通感染症の原因となるオロプーシュウイルスが、既に国内の野生動物生息地域に侵入している可能性があることを示した。今後ヒトへの感染リスクに対する対策を講じる必要性を提供した。

研究成果の概要(英文)：Orthobunyavirus is widely distributed all over the world and is a cause of zoonotic diseases that cause febrile illness and encephalitis in humans. Oropouche virus, a type of Orthobunyavirus, has been reported that the number of cases in South America has increased. In this study, we conducted the serological survey of Oropouche virus in wild animals in Japan. As a result, it was shown that the infection with Oropouche virus may have already spread to wild animals in the country. The results of this study indicate that the risk of domestic outbreaks of Orthobunyavirus infections that are infectious to humans may be increased.

研究分野：ウイルス学

キーワード：オルソブニヤウイルス モノクローナル抗体 人獣共通感染症 ブニヤウイルス 節足動物媒介性ウイルス 血清学調査 野生動物 競合ELISA

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

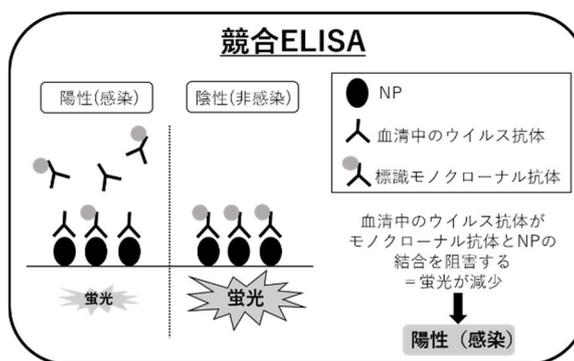
オルソブニヤウイルス(OBV)はクリミア・コンゴ出血熱やリフトバレー熱を引き起こすブニヤウイルス科に属し、18 の血清群で構成されている。蚊やダニなどの節足動物を媒介として自然宿主である野生動物のリス、シカ、またウシやヒツジ等の脊椎動物に感染し、ヒトに感染した場合には脳炎や発熱性疾患等を引き起こす。OBVs による脳炎・発熱性疾患は北米や北欧を含めた世界各地に分布するほか、アフリカでは近縁ウイルスの重感染による遺伝子再集合の結果生まれたリアソータントウイルスによる脳炎等のアウトブレイクが報告されている。

日本では牛の流産の原因となるアカバネウイルス(AKAV)が毎年発生しており、家畜衛生上の問題となっていることから AKAV に対する診断系は確立されているものの、その他の OBVs については情報および診断体制ともに不足している。特にベクターとなる節足動物との接触が多い野生動物の感染状況については、ほとんど調べられていない。節足動物媒介性ウイルスによる感染症はその多くが野生動物由来であることから、その感染状況を調べることでヒトにおける OBVs 感染症発生のリスクを評価できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は国内の野生動物における OBVs の感染状況を調べ、その成績に基づきヒトへの感染リスクを評価することを目標とする。

目標達成のためには、ヒトを含めて様々な種類の動物における OBVs に対する抗体を検出できる方法を確立することが必要となる。通常、動物の抗体検査ではそれぞれの動物種に特異的な二次抗体がないことが大きな障害となるが、競合 ELISA では標識した抗ウイルス抗体とウイルス抗原との結合を先に加えた試料中の抗体がどの程度阻害するかを測定するため、動物種を問わず血清中抗ウイルス抗体を1つのシステムで検出することができる。



3. 研究の方法

(1)抗体の作製

ヒトに感染性を持つウイルスとして、AKAV と同じシンプ血清群であり中南米で多くの感染が示唆されているオロプーシュウイルス(OROV)、アフリカで熱性疾患を引き起こすブニヤムウェラ血清群からブニヤムウェラウイルス(BUNV)を選択した。Vero 細胞に感染させ精製・不活化した各ウイルスをマウスに接種し、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作製した。

(2)競合 ELISA の確立

各ウイルスを BHK 細胞に感染させて回収した細胞溶解液を ELISA 抗原として調整した。得られた各抗体を用いて、競合 ELISA 構築のための条件検討を行った。当初は複数の抗体・抗原を混合し、複数の OBVs 感染を一括検出する方法を考えていたが、得られたモノクローナル抗体と ELISA 抗原の検出感度が大きく異なるため複数のウイルス検出は困難と判断した。そこで、以降は南米で多くの感染者が報告されている OROV にターゲットを絞って調査を行うこととした。

OROV-モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは大量培養し、得られた培養上清を精製・濃縮したのちビオチン標識した。競合 ELISA の陽性コントロールとして OROV-マウスポリクローナル抗体 2 種類、また陰性コントロールとして BUNV-マウスポリクローナル抗体 2 種類、主に北米に分布し脳炎が報告されている OBVs のジェームスタウンキャニオンウイルス(JCV)-マウスポリクローナル抗体、非感染マウス血清、非感染ニワトリ血清を用いて競合 ELISA を複数回行い、吸光(OD)値により平均値を測定して阻害率の値を算出した。

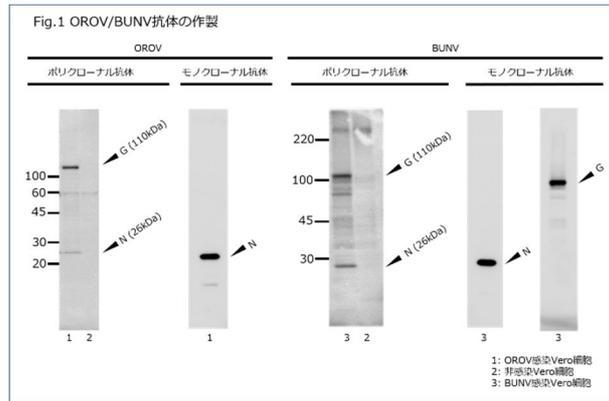
(3)野生動物の血清を用いた OBVs 感染状況の調査

齧歯類 16 検体(北海道大学大学院獣医学研究院の荻和宏明教授より分与)、シカ 142 検体・イノシシ 187 検体(国立感染症研究所獣医科学部の前田健部長より分与)、またペットとして飼われているイヌ 37 検体・ネコ 27 検体・鳥類 2 検体(国内獣医師より提供)、合計 411 検体の動物血清を用いて、競合 ELISA による OROV の感染状況を調査した。また同時に、非働化した動物血清を OROV と混和して Vero 細胞に感染させ、中和活性を持つ抗体の有無を蛍光免疫染色法にて確認した。

4. 研究成果

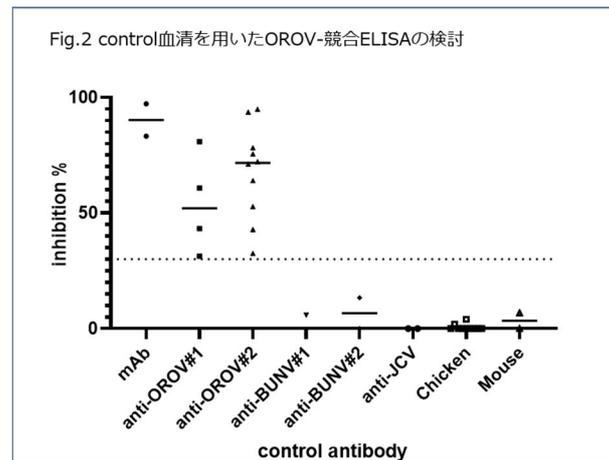
(1) 抗体の作製 (Fig.1)

得られた抗体について、可溶化した各ウイルス感染細胞に対する反応をウエスタンブロッティングによって抗原性を確認した。その結果、OROV と BUNV それぞれの核蛋白質(N)と糖蛋白質(G)に反応するポリクローナル抗体、OROV-N を認識するモノクローナル抗体、BUNV-N または BUNV-G をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を得た。OBVs の N はウイルス粒子や感染細胞中に豊富に存在していることから、N を認識するモノクローナル抗体を競合 ELISA に用いることとした。



(2) 競合 ELISA の確立 (Fig.2)

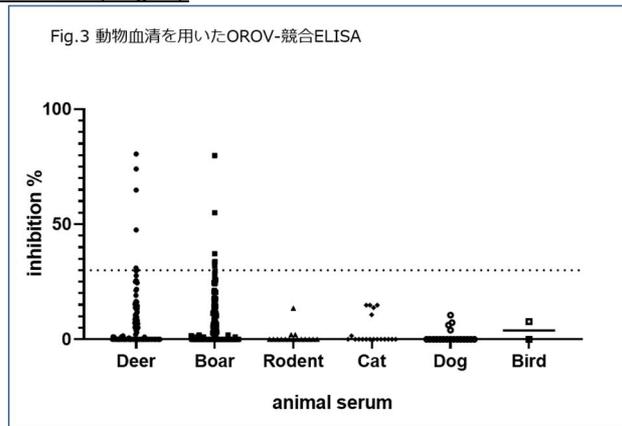
標識した OROV モノクローナル抗体と競合する陽性コントロールである未標識 OROV-モノクローナル抗体及び OROV-マウスポリクローナル抗体は平均して 50%以上の阻害効率を示した。一方陰性コントロール群は阻害率も低く抑えられていることから、この競合 ELISA により動物血清の OROV 感染における陽性・陰性の判別が可能と判断した。今回の結果より「阻害率 30%以上」を OROV に感染している可能性がある指標とした。



(3) 野生動物の血清を用いた OBVs 感染状況の調査 (Fig.3)

野生のシカ血清 6 検体及びイノシシ血清 6 検体は阻害率 30%以上の値を示し、中でもシカ 2 検体・イノシシ 1 検体は阻害率 70%以上の高い阻害率を示した。一方で野生の齧歯類、ペットのネコ・イヌ・鳥類には陽性を示す検体は検出されなかった。

同時に行った中和アッセイでは、シカ血清 3 検体・イノシシ血清 4 検体が OROV の Vero 細胞感染を阻害した。そのうちシカ 1 検体は競合 ELISA においても 70%を超える高い阻害率を示しており、OROV に感染している個体が存在する可能性が示された。



以上の結果より、国内のシカは既に OROV に感染し、またイノシシにも感染個体が存在する可能性が示唆された。一方でペットとして飼われている動物からは今回陽性検体が検出されなかったことから、その感染領域は都市部ではなく野生動物の生息地域に留まっていることが考えられた。

OROV 感染者が報告されているブラジルやペルー等の南米地域では、OROV 感染は節足動物媒介による野生動物間の森林サイクルと、ヒト間の都市サイクルの双方が感染経路として考えられている。本研究は国内に未検出であり人獣共通感染症の原因となる OROV が、既に国内の野生動物生息地域に侵入している可能性があることを示した。これら野生動物の感染が拡大することでヒトへの感染リスクが高まることは予測される事態であり、今後感染状況の更なる調査が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato H, Satoh M, Kawahara M, Kitaura S, Yoshikawa T, Fukushi S, Dimitrova K, Wood H, Saijo M, Takayama-Ito M.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Seroprevalence of Jamestown Canyon virus in the Japanese general population.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-020-05517-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 博史, 伊藤[高山] 睦代, 佐藤 正明, 河原 円香, 北浦 慧, 西條 政幸
2. 発表標題 脳炎を引き起こす節足動物媒介性ブニヤウイルスの診断系開発
3. 学会等名 日本神経感染症学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------