

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24405043

研究課題名(和文) 新規高効率ウイルス探索法を用いた人獣共通感染症の疫学調査

研究課題名(英文) Surveillance of zoonotic viral diseases by an efficient method for detection of viral genomes

研究代表者

澤 洋文(Sawa, Hirofumi)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：30292006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、野生動物の腸管から採集した糞便検体から、ウイルスゲノムを濃縮する方法を確立し、Virome解析を実施し、ヒトから単離されたブファウイルスに相同性を有する新規ブファウイルス(Mpulungu bufavirus)を検出することに成功した。また、解析により得られたブファウイルスのゲノム配列を基にしたnested PCR法を構築し、野生動物由来の536検体を用いて、ブファウイルスの感染状況を検索した結果、ジネズミ類の約1/3(17/49=34.7%)にブファウイルスのゲノムを検出した。本検出系はブファウイルスのスクリーニングに有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have succeeded to establish the enrichment of the viral genomes from wildlife intestinal contents.

Thereafter, we performed a deep sequencing using isolated and enriched viral nucleic acids. We have finally detected a novel bufavirus named Mpulungu bufavirus from shrew feces. We have determined the almost whole genome sequences of the novel bufavirus which has a homology with that of human bufavirus (more than 51-53% of amino acid identity).

Based on the obtained sequences, we established a nested PCR method for screening of bufaviruses in spleen samples from wildlife. Finally, we obtained the relatively high positive rate of detection of the viral genome in shrew (17/49=34.7%). Our established nested PCR method is useful for screening of the bufaviruses in mammals.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染症 病原微生物 ウイルス 野生動物

1. 研究開始当初の背景

赤道周囲の熱帯・亜熱帯地域では、AIDS、結核、マラリア等の注目されている感染症以外に neglected disease (顧みられない病気) と総称される多くの新興・再興感染症が存在しており、適切な診断や治療が行われず、人々が生命の危険にさらされており、また深刻な経済的被害を受けている。これらの新興・再興感染症の多くは、動物から人間へ感染する人獣共通感染症であり、蚊やダニといった媒介昆虫を介して感染することが多い。発展途上国が多いアフリカ諸国では、野生動物および家畜と人間の接触が多く、さらに衛生環境が整備されていないことによる媒介昆虫の繁殖や、医療技術が低いことにより、人獣共通感染症の発生が深刻な問題となっている。一方、灌漑等の開発および交通機関の発達に伴う、ヒトと野生動物の接触の増加、航空機による物資および人の輸送は、病原体を発生母地から世界的に拡散させている。さらに、地球温暖化の影響による蚊等の媒介昆虫の生息域の拡大により、従来熱帯・亜熱帯地域でのみ発生していた感染症の流行地域が地球全体に拡大することが予想される。

以上の様に人獣共通感染症に対する対策は国際的な喫緊の課題と考えられる。自然界の野生動物に寄生し、被害をおよぼさずに存続してきた微生物が、時折、家畜、家禽そして人間に伝播して悪性の人獣共通感染症となる。人獣共通感染症を世界から完全に根絶することは不可能であるが、先回り予防策をとることにより、それらによる被害を最小限度に食い止めることは可能である。そのためには、人獣共通感染症の原因となる自然宿主を特定し、伝播経路を解明し、その先回り予防策を達成することが重要である。

研究代表者および研究分担者が所属する北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターは、人獣共通感染症の先回り予防策として、自然界の微生物の宿主域、生態、病原性を明らかにすることを目的とし、2008年にアフリカ、ザンビア共和国のザンビア大学獣医学部内に Biosafety level-3 (BSL-3) および BSL-2 実験室を有するザンビア拠点を設置した。ザンビア拠点では、細胞培養実験、動物実験、シーケンサーを用いた実験も可能である。研究代表者(澤)は、これまでにザンビア拠点を中心として、25回以上の人獣共通感染症の疫学調査を実施しており、得られた結果を論文として報告している (Virus Res, 2012)。

研究分担者の石井は、ザンビアに2年間駐在し、ウイルス疾患のサーベイランスに従事し、新規ウイルスを単離した (Emerg Infect Dis, 2011)。また研究分担者の大場もザンビアで

疫学活動の結果、新規ウイルスを単離した (J Gen Virol, 2011)。

ザンビアは AIDS、マラリア、結核以外の感染症の診断体制が確立されておらず、臨床的に出血熱が疑われても診断が出来ず、原因不明の「Mysterious disease」として対処されている。例を挙げると、ザンビアで2008年に初めてヒト出血熱の発症例が報告されたが、ザンビア国内での診断はできず、また医療体制も不十分であることから発症者は飛行機で南アフリカ共和国に移送され、治療を受けた。最終的に、米国疾病予防管理センター(CDC)および南アフリカ国立健康検査局国立感染症研究所(NICD-NHLS)によって、原因病原体が新種のアレナウイルス (Lujovirus) であることが明らかとなった。

さらに、ザンビアの医療技術が未熟であることにより、周辺諸国で流行している感染症についてのザンビア国内の情報も乏しい。

例を挙げると、蚊媒介性のフラビウイルスにより発症する黄熱病やデング熱は、ザンビア周辺諸国では報告されているが (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/YF_GlobalMap.htm#yobi) および、(<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>)、現在の段階ではザンビアでは、それらの感染症は報告されておらず、フラビウイルス感染症のザンビア国での実態は明らかにされていないことが予想される。

以上の様に、ザンビアでは既知のウイルス感染症の診断も十分ではなく、さらに新規ウイルスによる感染症についても、全く診断が出来ない状況である。これらの問題点および申請者の現在の研究状況を踏まえて、本研究は医療環境が不備であるため感染症の発生状況が把握されていないアフリカ、ザンビア共和国において疫学調査を実施し、さらに「高効率のウイルス遺伝子探索法」を開発し、人獣共通感染症の原因となり得る既知および未知のウイルスを探索・同定することを目指す。

近年開発された次世代シーケンス技術は、従来の既知塩基配列を利用したシーケンス法とは異なり、ランダムに選択した10数万の遺伝子断片の配列を決定することで、全く未知の塩基配列情報を得ることができる。本技術を用いて、採集した動物や昆虫の検体中に、既知および新規のウイルスの遺伝子を検出できる。ウイルスの探索にも本技術が導入されており、感染症を発症した動物、臓器移植後に死亡した症例の臓器、咽喉部吸引液や糞便から病原体の遺伝子を検出した例は報告されている (Palacios-G et al. N Eng J Med, 2008, Nakamura-N et al. PLoS One, 2009)。しかし、従来の方法は、病原体遺伝子と比較して、圧倒的な量の宿主細胞中の遺伝子が優先的に検出され、ウイルスの遺伝子

を検出する感度が低いことが問題である。すなわち、従来の方法はウイルスの増殖が高度な病変部にのみ有用であることが予想される。本研究は、この問題点を改良し、検体中のウイルス由来遺伝子を濃縮する方法を開発し、次世代シーケンサーを用いて既知および未知のウイルス遺伝子を探索する。

2. 研究の目的

本研究は国際的な喫緊の課題である人獣共通感染症に対する対策として、人獣共通感染症の自然宿主を特定し、伝播経路を解明し、その先回り予防策を達成するために、医療環境が不備であるため感染症の発生状況が把握されていないアフリカ、ザンビア共和国において疫学調査を実施する。さらに新規高効率ウイルス遺伝子探索法を開発し、疫学調査で得られた検体から、人獣共通感染症の原因となり得る既知および未知のウイルスを探索・同定することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では以下の(1)-(4)の研究方法を実施することにより計画を推進する。

- (1) 医療環境が不備であるため感染症の発生状況が把握されていないアフリカ、ザンビア共和国において疫学調査を実施する。
- (2) 新規高効率ウイルス遺伝子探索法を開発する。
- (3) 疫学調査で得られた検体から、開発した新規高効率ウイルス遺伝子探索法および次世代シーケンサーを用いて、人獣共通感染症の原因となり得る既知および未知のウイルス遺伝子を探索する。
- (4) 得られたウイルス遺伝子情報に基づいて、ウイルスを単離し、ウイルスの性状の解析、診断方法の確立、治療法の基盤的知見の創出を試みる。

4. 研究成果

(1) 高効率ウイルス遺伝子探索法の開発

本研究において、環状 DNA をバクテリオファージ由来の Phi29 ポリメラーゼにより指数関数的に増幅させる Rolling circle amplification (RCA)法により、宿主細胞中の微量な既知および未知の環状 DNA ウイルスのゲノムを網羅的に検出することを試みた。本法を用いてげっ歯類動物の臓器から抽出した核酸から、環状 2 本鎖 DNA ウイルスのゲノム全長を検出することに成功した。

また、野生動物由来の臓器を哺乳類細胞に接種し、その上清に放出されるウイルス粒子に含まれるゲノムを次世代シーケンサーで検出する方法を確立し、多くの新規ウイルスを単離した。しかし、細胞での増殖においてウイルスが細胞に感受性を有することが必要となるため、検体からの網羅的解析とはならないことが本法の欠点である。

そこで、野生動物由来の検体から効率的に、

未知・既知のウイルスゲノムを検出するために、以下の方法を考案した。

野生動物の腸管から採集した糞便を溶液に懸濁した後に、フィルターで濾過・濃縮して、DNase、Benzonase、RNaseA で処理した後に、核酸を抽出した。抽出した DNA はそのまま、RNA は random hexamer を用いて dscDNA を合成した後に、Ion PGM sequencer を用いて解析を実施した。

得られた結果を NCBI データベースの BLASTN を用いて照合した結果、Ion PGM を用いて取得した約 624 万リード（平均長 266 bp）のデータの内、約 89.3 万リードが系統分類可能な配列であった。その中で 72.6 万リード（81.2%）がウイルスのゲノム由来のリード、約 12.4 万リード（14.0%）が細菌のゲノム由来、約 23 万リード（2.6%）が真核生物由来であることが判明した（図 1）。

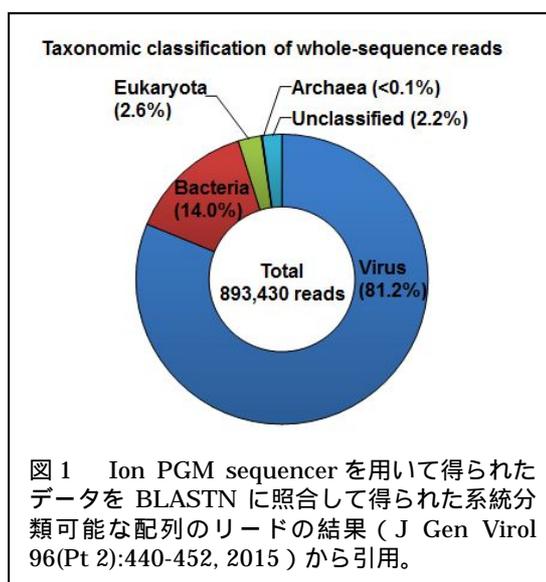


図 1 Ion PGM sequencer を用いて得られたデータを BLASTN に照合して得られた系統分類可能な配列のリードの結果 (J Gen Virol 96(Pt 2):440-452, 2015) から引用。

以上の結果から、本法はウイルスゲノムを濃縮するのに有用であったことが示された。また、本法は検体中のウイルス遺伝子を高感度に検出し得る、次世代シーケンス技術を利用した探索を可能とする方法と考えられた。

(2) ウイルスの性状の解析、診断方法の確立、治療法の基盤的知見の創出

(1)で記載したウイルスゲノムを濃縮する方法および次世代シーケンサーを用いて得られた結果に基づいて、以下のプファウイルスに関する研究を実施した。

プファウイルスは、直鎖一本鎖 DNA をゲノムとするウイルスである。プファウイルスは 2012 年にブルキナ・ファソの小児の下痢症例から検出され、さらに、ブータン、フィンランド、オランダの胃腸炎の症例の糞便からも検出されている。

本研究において、ザンビアのジネズミ由来の検体からほぼ完全長のプファウイルスのゲノムを検出した。NCBI データベースの blastp 検索により、ウイルスのコードするタンパク質である NS1 のアミノ酸配列を検索

した結果、検出されたウイルスはヒトのブファウイルスと相同性（50%以上）を有していた。

以上の結果から本ウイルスはプロトパルボウイルス科に属する新規のウイルスであることが判明した（図2）。

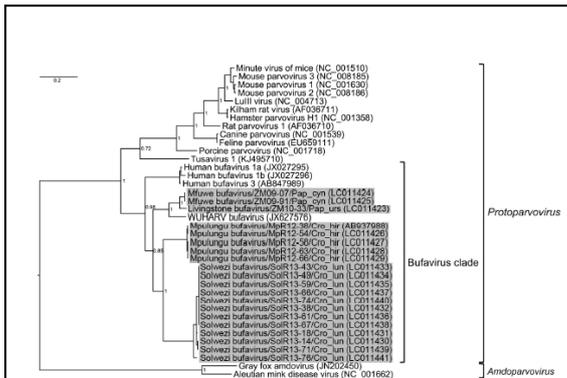


図2 NS1 遺伝子の部分配列を用いて実施したブファウイルスの系統解析の結果。灰色で示した部分が本研究で検出したブファウイルス（Emerg Infect Dis 21(7):1230-1233, 2015 から引用）。

さらに、得られたゲノムの配列を基に degenerate primer を設計して、nested PCR の系を作成した。本診断系を用いて、野生動物におけるブファウイルスのゲノムの検出率を調査した結果、サル（3/189=1.58%）、ジネズミ（17/49=34.7%）で陽性検体が得られたが、げっ歯類動物（0/298=0%）からは陽性検体は得られなかった。以上、野生動物から得られた総計 536 検体中 20 検体（3.73%）にブファウイルスのゲノムを検出した（図3）。

Animal species (common name)	Location	Year	PCR positive/total
Primate			
Papio cynocephalus (yellow baboon)	Mtwee	2009	2/50
P. ursinus (chacma baboon)	Livingstone	2010-2011	1/50
Chlorocebus pygmyrhesus (vervet monkey)	Mtwee	2009	0/50
	Livingstone	2010-2011	0/39
Shrew			
Crocidura hirta (lesser red musk shrew)	Livingstone	2011	0/2
	Mpulungu	2012	5/22
	Namwala	2012	0/2
	Mazabuka	2013	0/4
	Solwezi	2013	0/2
C. luna (moonshine shrew)	Mpulungu	2012	0/1
	Solwezi	2013	12/16
Rodent			
Mastomys natalensis (African soft-furred rat)	Livingstone	2011	0/35
	Mpulungu	2012	0/28
	Namwala	2012	0/29
	Mazabuka	2013	0/57
	Solwezi	2013	0/56
Other species†			
	Livingstone	2011	0/9
	Mpulungu	2012	0/20
	Namwala	2012	0/54
	Mazabuka	2013	0/16
	Solwezi	2013	0/14
Total			20/536

図3 nested PCR を用いた野生動物におけるブファウイルスのゲノムの調査の結果（Emerg Infect Dis 21(7):1230-1233, 2015 から引用）。

以上の結果から、本研究により開発したブファウイルスの診断系が野生動物のブファウイルスのスクリーニング、およびブファウイルスの感染経路の解析に有用であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Sasaki M, Orba Y, Anindita PD, Ishii A, Ueno K, Hang'ombe BM, Mweene AS, Ito K, Sawa H: Distinct lineages of bufavirus in wild shrews and nonhuman primates. Emerg Infect Dis(査読有)21(7):1230-1233, 2015
doi: 10.3201/eid2107.141969

Sasaki M, Orba Y, Ueno K, Ishii A, Moonga L, Hang'mbe BM, Mweene AS, Ito K, Sawa H: Metagenomic analysis of the shrew enteric virome reveals novel viruses related to human stool-associated viruses. J Gen Virol(査読有)96(Pt 2):440-452, 2015
doi: 10.1099/vir.0.071209-0

Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Ogawa H, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H: Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. J Gen Virol (査読有) 96(Pt 2):390-394, 2015.
doi: 10.1099/vir.0.070219-0

Ishii A, Ueno K, Orba Y, Sasaki M, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Umemura T, Ito K, Hall WW, Sawa H: A nairovirus isolated from African bats causes haemorrhagic gastroenteritis and severe hepatic disease in mice. Nat Commun (査読有) Dec 2: 5:5651, 2014
doi: 10.1038/ncomms6651

Muleya W, Sasaki M, Orba Y, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa M, Ogawa H, Hang'ombe B, Namangala B, Mweene A, Takada A, Kimura T, Sawa H: Molecular epidemiology of paramyxoviruses in frugivorous Eidolon helvum bats in Zambia. J Vet Med Sci (査読有) 76(4):611-614, 2014
doi: 10.1292/jvms.13-0518

Sasaki M, Muleya W, Ishii A, Orba Y, Hangombe BM, Mweene AS, Moonga L, Thomas Y, Kimura T, Sawa H: Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. J Gen Virol (査読有) 95(Pt 2):325-330, 2014
doi: 10.1099/vir.0.058404-0

Yamaguchi H, Kobayashi S, Ishii A, Ogawa H, Nakamura I, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H, Orba Y: Identification of a novel polyomavirus from vervet monkeys in Zambia. J Gen Virol (査読有) 94(Pt 6): 1357-1364, 2013
doi: 10.1099/vir.0.050740-0

Sasaki M, Ishii A, Orba Y, Thomas Y,

Hang'ombe BM, Moonga L, Mweene AS, Ogawa H, Nakamura I, Kimura T, Sawa H: Human parainfluenza virus type 3 in wild primates, Zambia. *Emerg Infect Dis* (査読有) 19 (9): 1500-1503, 2013
doi: 10.3201/eid1909.121404

〔学会発表〕(計 14 件)

発表者 2 名(大場 靖子他) ザンビア共和国に生息する蚊が保有するウイルスの調査。第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 - 24 日、福岡国際会議場、福岡

発表者 6 名(佐々木 道仁 他) Identification of distinct lineages of parvovirus in wildlife. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日-24 日、福岡国際会議場、福岡

発表者 8 名(Sasaki M 他) Identification of distinct lineages of bufavirus in wildlife. The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), September 16-17, 2015, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan

発表者 4 名(Sawa H 他) Epidemiological and Basic Research Activities Targeting Polyomaviruses. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 8, 2015, Awaji Yumebutai, Awaji, Japan,

発表者 6 名(佐々木 道仁 他) 野生動物から検出された新規パルボウイルスの系統解析。第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学、十和田

発表者 6 名(澤 洋文 他) 野生動物から検出された新規パルボウイルスの系統解析。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜会議センター、横浜

発表者 6 名(佐々木 道仁 他) 糞便メタゲノム解析によるジネズミ保有ウイルスの検索。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜会議センター、横浜

発表者 6 名(佐々木 道仁 他) 糞便メタゲノム解析によるジネズミ保有ウイルスの検索。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日-12 日、パシフィコ横浜会議センター、横浜

発表者 7 名(山口 宏樹 他) 霊長類動物からの新規ポリオーマウイルスの検出。第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3

日-6 日、神戸ポートアイランド、神戸

発表者 10 名(澤 洋文 他) ザンビア共和国の野生動物におけるパラミクソウイルスの疫学調査。第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸ポートアイランド、神戸

発表者 8 名(Sasaki M 他) Human parainfluenza virus type 3 infection in wild primates. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、マリンメッセ福岡、福岡

発表者 8 名(佐々木 道仁 他) 霊長類動物におけるラインフルエンザウイルスの疫学調査。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13 - 15 日、グランキューブ大阪、大阪

発表者 9 名(大場 靖子他) ザンビアの野生動物におけるオルソポックスウイルス感染の疫学調査。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13 - 15 日、グランキューブ大阪、大阪

発表者 8 名(山口 宏樹 他) ザンビアにおける霊長類動物からの新規ポリオーマウイルスの検出。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13 - 15 日、グランキューブ大阪、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔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・診断部門ホームページ
<http://www.czc.hokudai.ac.jp/pathobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 洋文(SAWA, Hirofumi)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号: 30292006

(2) 研究分担者

大場 靖子(ORBA, 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

石井 秋宏(ISHII, Akihiro)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター

一・助教

研究者番号：90421982