

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14860

研究課題名(和文) 共生細菌を用いたウイルス予防戦略

研究課題名(英文) Virus prevention strategy using symbiosis bacteria

研究代表者

新井 智 (ARAI, SATORU)

国立感染症研究所・感染症疫学センター・主任研究官

研究者番号：80321868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本、ベトナム、インドネシア、フィリピン、カンボジアに生息するコガタアカイエカ、ニセシロハシイエカ、シロハシイエカ、カラツイエカ、ハマダライエカ、アカイエカ、クロフクシヒゲカ、ヤマトクシヒゲカ、ヤマトヤブカを対象にボルバキア感染を検索したが、感染はわずかにアカイエカにのみであった。COI遺伝子を用いた媒介蚊の比較を行ったところ、ボルバキア感染の検出されなかったコガタアカイエカでは数%の種内多様性が認められるのに対して、ボルバキア感染の検出されたアカイエカでは0.2-0.3%でボルバキア感染がボトルネックとして作用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Exhaustive attempts to detect Wolbachia infection were unsuccessful in *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui*, *Culex pseudovishnui*, *Culex bitaeniorhynchus*, *Culex orientalis*, *Culex nigropunctatus*, *Culex sasai* and *Aedes japonicus* in Japan, Vietnam, Indonesia, Philippines and Cambodia. Wolbachia infection was detected in only *Culex pipiens*. Molecular identification and comparison of the mosquitoes based on morphological features was achieved by amplification and sequencing of the 1,537-nucleotide mtDNA COI gene. Genetic diversities of *Cx. tritaeniorhynchus* without Wolbachia were more than a few percent but diversities of *Cx. pipiens* with Wolbachia were about 0.2-0.3%, suggested that Wolbachia infection might be effected for biological diversities of *Cx. pipiens*.

研究分野：ウイルス感染

キーワード：共生細菌 ウイルス感染 媒介蚊

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスや日本脳炎ウイルス、また、マラリアやリケッチア等病原体を媒介する昆虫やダニなどの節足動物では、ボルバキアなどの共生細菌によって新たに生まれてくる世代の性比や寿命が変動することが知られており、このような作用を利用し、ネッタイシマカにボルバキアを感染させてデングウイルスを媒介するネッタイシマカの成虫中期の期間を短縮し、ウイルス媒介期間を短縮する試みが行われた。非感染ネッタイシマカの寿命が約 60 日なのに比べ、感染ネッタイシマカが約 30 日と成虫寿命を半分にすることに成功した。また、ボルバキアに感染した蚊は、優位にウイルス媒介能が低下していることも明らかになった。この実験には、キイロショウジョウバエに感染していた本来なら蚊に感染することのない実験室維持株が用いられた。実験室株を用いることは、自然界に特殊な系統の病原体を蔓延させることになり、将来的な影響は不明である。しかし、本来、蚊に感染した系統の共生細菌でも同様の結果が得られるなら、特殊な系統の自然界への拡大も考慮する必要が無く、有効なベクターコントロールの手法の一つと成りうる。

2. 研究の目的

デングウイルス、日本脳炎ウイルス、マラリアは蚊によって、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスや日本紅班熱などの感染症は、ダニによって媒介されることが知られている。これら病原体は吸血によって蚊やダニの体内に取り込まれ、ベクター体内での増殖期間を経て、初めて感染能を獲得する。ベクター体内での増殖期間は病原体によって異なるが、デングウイルスやマラリアでは2週間程度と比較的長く、このことは成虫中期から後期が重要な感染源であることを意味している。これら病原体を媒介する昆虫やダニなどの節足動物では、ボルバキアなどの共生細菌によって新たに生まれてくる世代の性比や寿命が変動することが知られており、このような作用を利用し、ネッタイシマカにボルバキアを感染させてデングウイルスを媒介するネッタイシマカの成虫中期の期間を短縮し、ウイルス媒介期間を短縮する試みが行われた。非感染ネッタイシマカの寿命が約 60 日なのに比べ、感染ネッタイシマカが約 30 日と成虫寿命を半分にすることに成功した。また、ボルバキアに感染した蚊は、優位にウイルス媒介能が低下していることも明らかになった。この実験には、キイロショウジョウバエに感染していた本来なら蚊に感染することのない実験室維持株が用いられた。実験室株を用いることは、自然界に特殊な系統の病原体を蔓延させることになり、将来的な影響は不明である。しかし、本来、蚊に感染した系統の共生細菌でも同様の結果が得られるなら、特殊な系統の自然界への拡

大も考慮する必要が無く、有効なベクターコントロールの手法の一つと成りうる。

一方、日本脳炎ウイルスの主な媒介蚊であるコガタアカイエカやニセシロハシイエカの共生細菌に関する知見は全く得られていない。そこで特にウイルス感染を媒介する蚊を対象にできるだけ多数検出することを目的として広く共生細菌の検索を行った。これまでの知見から感染症を引き起こすベクターが自然に感染している共生細菌の感染率を上昇させるだけで感染症の感染リスクを低下させることが可能となる。このような共生細菌や系統を見出すことは学術的だけでなく公衆衛生学的にも、生物学的にも極めて意義のあることであり、今後、自然環境に配慮したベクターコントロールの手法の一つと発展するものと推測する。

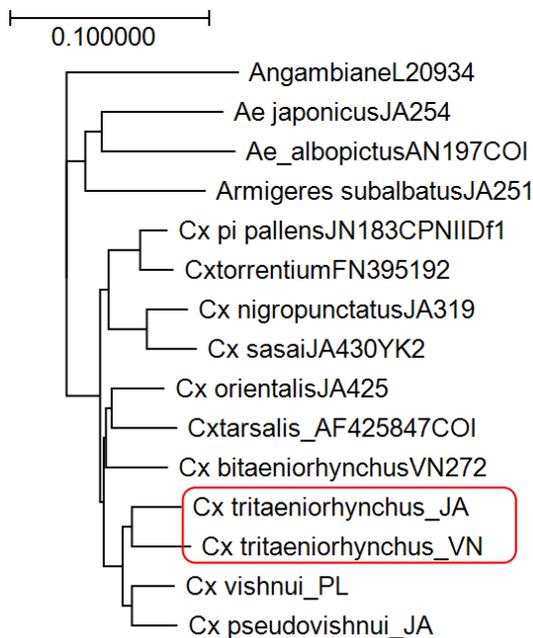
3. 研究の方法

病原体を媒介する蚊やダニに共生している共生細菌を PCR や次世代シーケンサーを用いて網羅的に検出・同定すると共に、共生細菌を分離し、ウイルス増殖に与える影響や作用を明らかにする。また、博物館で保管された蚊やマダニについても同様に共生細菌を検出・同定し、過去から現在までの共生細菌の拡散状況や地理的な多様性について明らかにする。得られた共生細菌を用いてウイルス増殖への影響などを考慮し、シミュレーションを使って効果的なウイルス伝搬阻止方法を検討する。

4. 研究成果

日本、ベトナム、インドネシア、フィリピン、カンボジアに生息するコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)、ニセシロハシイエカ (*Culex vishnui*)、シロハシイエカ (*Culex pseudovishnui*)、カラツイエカ (*Culex bitaeniorhynchus*)、ハマダライエカ (*Culex orientalis*)、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*)、クロフクシヒゲカ (*Culex nigropunctatus*)、ヤマトクシヒゲカ (*Culex sasai*)、ヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*) を対象にボルバキア感染を検索したが、感染はわずかにアカイエカにのみであった。これらの結果から、ネッタイシマカ対策に用いているボルバキアを用いる手法は、多様な蚊種に対して有効と示唆された。世界各地でボルバキアを用いた媒介蚊対策が実施されているが、これらの対策も効果が得られると予想される。一方、形態を基にした蚊の分類は、高度な分類学的な知識と経験を必要とし、サンプルの保存状態などに依存してテクニカルエラーによる誤分類や判定不能サンプルが発生する。そこで、簡便で信頼性の高い分類技術の開発のため、蚊種のミトコンドリア遺伝子全長配列の決定とその配列を基にした分類技術の開発を行った。これまでにコガタアカイエカ、ニセシロハシイエカ、シロハシイエカ、カラツイエカの全長ミトコンドリア

配列の決定に成功した。全長配列のサイズはそれぞれ 15,580-bp から 15,590-bp で繰り返し配列の数に若干のばらつきが認められるものの、ほぼ近似したサイズであった。日本脳炎ウイルスの主要な媒介蚊であるコガタアカイエカ、ニセシロハシエカ、シロハシエカはコガタアカイエカが2グループのクラスターを形成し、3種ではなく4種が妥当と示唆された。今後、ミトコンドリア配列を利用し分類を整理する必要があるだろう。一方、日本、エチオピア、インドネシア、韓国、ミャンマー、ベトナムで捕獲されたアカイエカ群の COI 遺伝子を用いた系統解析では、アカイエカ群の COI 遺伝子は極めて均一であった。



COI 遺伝子を用いた系統解析

コガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*) は、2つに分岐し2タイプ存在していることが明らかになった。ニセシロハシエカ (*Cx. vishnui*) とシロハシエカ (*Cx. pseudovishnui*) の違いとコガタアカイエカの2グループの違いはほぼ同程度と考えられ、コガタアカイエカも2種に分類される可能性が明らかになった。

ボルバキア感染の確認できなかったコガタアカイエカでは、ミトコンドリア遺伝子の種内変異は数%認められるのに対してアカイエカ群では 0.2-0.3%のみで地理的なクラスターも検出できなかった。ボルバキアは経卵感染の母系で維持されており、ボルバキア感染がボトルネックとして作用し、ボルバキア感染に対して有利な系統のみが選別・選択されている可能性が示唆される。これらの現象は、環境中にボルバキア+系統を拡散させた場合にも顕在化する可能性があり、現時点で

は確認されていないがボルバキア感染抵抗性系統が出現する可能性が示唆される。ブラジルや中国等で現在進められている環境中へのボルバキア感染蚊の散布により、今後、生物多様性にどのような影響が顕在化してくるか十分注意する必要がある。

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0件)

[学会発表](計1件)

新井 智、松岡裕之、青木啓太、多屋馨子、沢辺京子、森川 茂、大石和徳。コガタアカイエカのミトコンドリア配列。第159回日本獣医学会学術集会。北海道札幌市。2016年10月23-25。

[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
無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 智 (ARAI SATORU)

国立感染症研究所・感染症疫学センター
主任研究官
研究者番号：80321868

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

森川 茂 (MORIKAWA SHIGERU)
国立感染症研究所・獣医科学部
部長
研究者番号：00167686

(4) 研究協力者

水谷哲也 (MIZUTANI TETSUYA)
東京農工大学・農学部附属国際家畜感染症
防疫研究教育センター
センター長兼教授

青木啓太 (AOKI KEITA)

国立感染症研究所・感染症疫学センター
非常勤職員

菊池風花 (KIKUCHI FUKA)
国立感染症研究所・感染症疫学センター
臨時研究補助員
