

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：80106

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19860

研究課題名（和文）北海道の蚊から検出された新たなブニヤウイルスの分布調査と性状解析

研究課題名（英文）Survey and characterization of the novel bunyavirus detected in mosquitoes in Hokkaido

研究代表者

駒込 理佳（Komagome, Rika）

北海道立衛生研究所・その他部局等・主査

研究者番号：40414312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,400,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は国内のヤマトヤブカを採取し、新規ブニヤウイルスの遺伝子の有無を調査したところ、全ての地域からウイルス遺伝子が検出されたため、広く国内に分布していることが明らかとなった。ウイルス陽性蚊の抽出物を様々な哺乳類由来の培養細胞に添加したがウイルスの増殖や細胞変性効果は認められなかったため、ウイルスが哺乳類に対して病原性を持つことは確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回調査した全ての地域のヤマトヤブカから新規のブニヤウイルスの遺伝子が検出された。系統樹解析の結果より、中国と九州地方のウイルス遺伝子は北海道、東北、関東地方と異なるクラスターに分岐していた。従って、このウイルスの遺伝子多型はヤマトヤブカの集団遺伝的構造の解明に応用できる可能性があると考えられた。病原性の有無に関しては、ウイルス分離に汎用されている培養細胞にウイルス陽性検体抽出物を添加して培養しても、細胞変性効果は認められず、細胞からウイルス遺伝子も検出されなかったため、ウイルスが哺乳類に対して病原性を持つことは確認されなかった。

研究成果の概要（英文）：We collected mosquitoes (*Aedes japonicus*) in Japan. The novel bunyavirus positive mosquitoes were distributed widely throughout Japan. Extracts of the virus positive mosquitoes were added to mammalian cell lines, but virus growth and cytopathic effects were not observed in these cell lines. Therefore, the pathogenicity of the novel bunyavirus in mammals were not confirmed by these experiments.

研究分野：ウイルス

キーワード：蚊 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ジカウイルスやチクングニアウイルスなどに代表される蚊媒介性感染症は、病原体への感染性を有する蚊が生息する地域に病原体が持ち込まれると、ヒトや物流の活発な移動に伴い、分布域が急速に拡大する例がしばしば認められる。我々は北海道内で採集した8種類の蚊の中で、ヤマトヤブカから既に報告されているブニヤウイルスと約50%の相同性を示す新たなブニヤウイルス遺伝子を検出した。ブニヤウイルスはリフトバレー熱ウイルスやSFTSウイルス等、ヒトに重篤な疾患を引き起こすウイルスが多数含まれている。ヤマトヤブカは全国に生息しており、ヒトへの吸血嗜好性があるため、本ウイルスがヒトへの病原性を有する場合、広範囲の人々が感染の脅威に晒されることになる。このため、宿主域や病原性など詳細なウイルスの性状解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、この新規ウイルスの全国的な分布、哺乳類への病原性の有無、遺伝子多型と蚊の地理的分布との相関など、詳細な性状を明らかにし、公衆衛生学的に注意を要する病原体かどうかを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 蚊からのウイルス遺伝子検出

北海道から九州まで、各地のタイヤのたまり水や木の窪のたまり水等の野外の環境水を採取し、ボウフラから飼育羽化させ、顕微鏡下による観察でヤマトヤブカと確認できた成虫個体を1匹ずつ回収した。岩手県に関しては岩手県環境保健研究センターの協力のもと、岩手県が蚊の生息調査のため捕集したヤマトヤブカ成虫を分与してもらい、本研究に供した。1個体ずつパイオマッシャーを使用して虫体を破砕し、PBSに懸濁後、市販試薬を用いてRNAを精製した。RNAをブニヤウイルス検出用のプライマーでリアルタイムRT-PCR法により増幅し、ウイルス遺伝子が増幅された検体はダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、新規ブニヤウイルスの有無を確認した。

2) 培養細胞でのウイルス分離

ヒトへの病原性を持つウイルスはヒトを含む哺乳類由来の培養細胞に細胞変性効果を持つものが多いことから、培養細胞を利用して病原性の有無の推測を行った。ウイルス陽性が確認された蚊の抽出液を、VeroE6、RD-18S、293、A549、FL、HEp-2、L929の7つの哺乳類由来培養細胞に添加して培養し、1週間ごとに3回継代した。細胞変性の有無を顕微鏡下で観察し、3回継代後の細胞からRNAを精製してリアルタイムRT-PCR法によりウイルス遺伝子の増幅の有無を確認した。

3) 野生動物へのウイルス伝播

蚊から動物へウイルスの伝播が行われている可能性を検証するため、ウイルス陽性の蚊の採取地点付近(札幌市)で野鼠25匹をトラップにより捕獲し、血液と脾臓を採材した。血清および脾臓抽出液から市販試薬を用いてRNAを精製し、リアルタイムRT-PCR法によりブニヤウイルス遺伝子の検出を試みた。

4. 研究成果

1) ウイルスの分布

表1に示したように、北海道においては、札幌市、千歳市(道央地域)、初山別村(道北地域)の全てでヤマトヤブカより新規ブニヤウイルス遺伝子が検出された。東北地方の岩手県においては、一関市と滝沢市、釜石市のヤマトヤブカからはウイルス遺伝子は検出されなかったが、宮古市、盛岡市、久慈市、大迫町からは検出された。関東地方の東京都のヤマトヤブカにおいてもウイルス遺伝子が検出された。さらに、中国地方の山口県、九州地方の宮崎県のヤマトヤブカにおいてもウイルス遺伝子が検出されたため、このウイルスは日本全域に分布していることが明らかとなった。また、ウイルスのRdRp(RNA依存性RNAポリメラーゼ)遺伝子の部分配列を近隣結合法により系統樹

都道府県	総数	陽性	陽性率	市町村	総数	陽性	陽性率
北海道	190	83	44%	札幌市	112	44	39%
				千歳市	46	31	67%
				初山別村	32	8	25%
岩手県	44	5	11%	宮古市	4	2	50%
				盛岡市	4	1	25%
				一関市	6	0	0%
				久慈市	4	1	25%
				釜石市	11	0	0%
				滝沢市	11	0	0%
				大槌町	4	1	25%
東京都	3	2	67%	八王子市	3	2	67%
山口県	8	2	25%	山口市	8	2	25%
宮崎県	35	15	43%	五ヶ瀬町	35	15	43%

表1 各地のヤマトヤブカの新規ブニヤウイルス遺伝子陽性数

解析を行ったところ、九州（宮崎）と中国（山口）の西日本地方のウイルスは、北海道、東北、関東のウイルスとは違うクレードに分かれていた（図1）。従ってこのウイルスの遺伝子多型はヤマトヤブカの集団的遺伝構造の解明に応用できる可能性があると考えられた。

## 2) 病原性の推測

ウイルス陽性蚊抽出液をVeroE6細胞など7種類の哺乳類由来培養細胞の培養上清に添加して培養し、細胞変性効果を観察したが、形態変化は認められず、細胞からRNAを精製してリアルタイムRT-PCR法によりウイルス遺伝子を増幅したが、検出されなかったため、細胞内でのウイルスの増殖を確認できなかった。これらの結果から、新規ブニヤウイルスが哺乳類への病原性を持たない可能性が示唆された。

## 3) 動物へのウイルスの伝搬

ウイルス陽性蚊が生息する地域の野鼠の血清からも脾臓からも新規ブニヤウイルスは検出されなかった。従って蚊から哺乳類動物へのウイルスの伝播は確認されなかった。

以上の結果から、このウイルスは日本各地のヤマトヤブカが広く保有するが、哺乳類への病原性及び感染性はないものと考えられた。ウイルスの地理的変異とヤマトヤブカの地域集団との関係についてはさらなる研究が必要である。

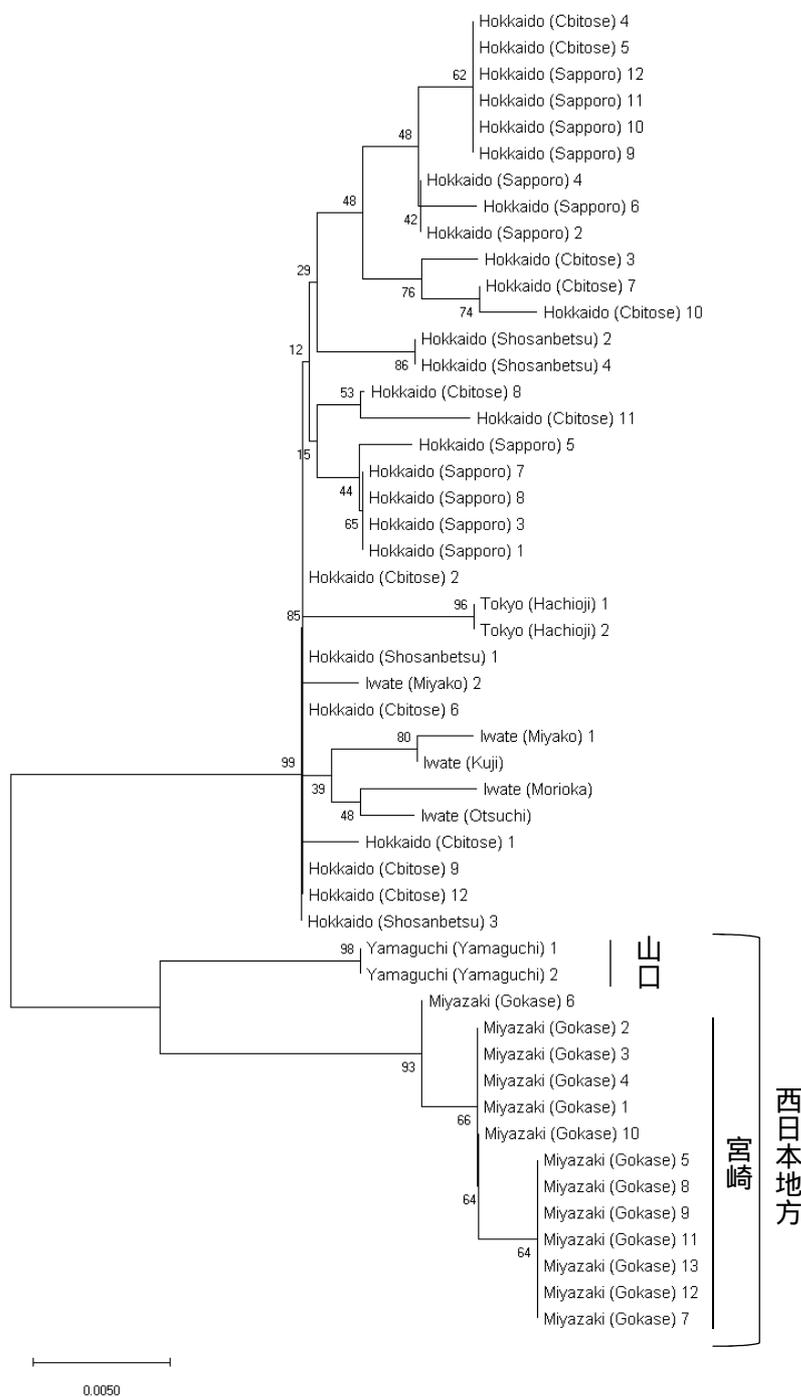


図1 新規ブニヤウイルスの RdRp 遺伝子の部分配列の系統樹解析（近隣結合法）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊東拓也
2. 発表標題 北海道産セスジヤブカ亜属蚊の18S rRNA遺伝子による同定
3. 学会等名 第70回 日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東拓也
2. 発表標題 北海道におけるヤブカ属セスジヤブカ亜属蚊の最近の分布
3. 学会等名 第71回 日本衛生動物学会大会
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
研究分担者	三好 正浩  (Miyoshi Masahiro)  (50414321)	北海道立衛生研究所・その他部局等・主幹   (80106)	
研究分担者	山口 宏樹  (Yamaguchi Hiroki)  (50777836)	北海道立衛生研究所・その他部局等・研究職員   (80106)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	伊東 拓也  (Ito Takuya)  (90414309)	北海道立衛生研究所・その他部局等・主幹    (80106)	