

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19411

研究課題名(和文) 中部アフリカにおける野生動物保有病原体の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析

研究課題名(英文) Identification of pathogens in wildlife using next-generation sequencing in Central Africa

研究代表者

阿部 遥 (ABE, Haruka)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：90554353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中部アフリカのガボン共和国においてブッシュミートとして入手可能な野生動物(ヤマアラシ、ブルーダイカー等)や小型野生動物(げっ歯類、食虫類等)を合計395検体採取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的なメタゲノム解析を行った結果、肝炎ウイルス・ロタウイルス・アストロウイルス等のヒト感染を起こし得るウイルスを多数検出した。また、検出したウイルスゲノム配列を用いて系統樹解析を行ったところ、ガボン共和国特有の系統に属するウイルスを多く見出した。以上から、野生動物を介した人獣共通ウイルス感染症の感染リスクを明らかにしたとともに、ウイルスが中部アフリカで独自に進化していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中部アフリカに位置するガボン共和国は国土の80%以上が熱帯雨林であり、野生動物が現地民の住環境の比較的近辺にまで存在している。また、ガボンではブッシュミート(野生動物の食肉)の消費量がアフリカの中でも多く、野生動物からの病原体感染リスクが高いにもかかわらず野生動物を対象とする研究は進んでいない。本研究では野生動物に存在しヒト感染を起こし得る病原ウイルスを多数明らかにすることで、現地での野生動物を介したウイルス感染に対する注意喚起するとともに、現地の医療機関における適切な診断や治療にも貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, 395 wild animals were collected to find pathogens that potentially infect humans in Gabon, Central Africa. Animal samples included bushmeat (porcupines, blue duikers, etc.) and small mammals (rodents and shrews). Metagenome analysis of animal samples revealed the existence of pathogenic viruses, such as hepatitis virus, rotavirus, and astrovirus. Phylogenetic analysis of the detected viral genome sequence indicated a unique evolutionary process of several pathogenic viruses in Gabon. These results showed the risks of zoonotic viral infections through direct contacts with wild animals, and also revealed a Central Africa-specific evolution of viruses.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：アフリカ ガボン 野生動物 ブッシュミート ウイルス メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、アフリカにおけるエボラ出血熱の大規模流行 (Ebola virus disease, WHO, 2018) やサル痘のヒト感染 (Durski et al., MMWR CDC, 2018) など野生動物由来の感染症の発生が多数報告されている。このような野生動物由来の感染症の実態を把握することは公衆衛生の観点から重要な課題となっているが、特にアフリカ諸国においては、ヒトを対象とした報告に比較して、野生動物の保有病原体やそのヒト感染に至る経緯についての報告が大変少なく、野生動物からの病原体感染リスクはほとんど明らかにされていないのが現状である。

ガボン共和国は中部アフリカ沿岸に位置する赤道直下の国で、ブッシュミート (野生動物の食肉) の消費量が多い国の一つである (Wilkie DS, Biodivers. Conserv., 1999)。ガボン共和国では過去にエボラ出血熱の発生を始め野生動物由来の感染症が問題となってきたが、野生動物を対象とした病原体解析はほとんど行われておらず、ブッシュミートを介して感染症が一般市民へ拡大してしまうリスクが常に存在している。そのため、ガボン共和国ではブッシュミート由来の人獣共通感染症の感染リスクを明らかにすることが強く望まれている (Gabon DGEF report, 2010)。

2. 研究の目的

中部アフリカの野生動物、特に非ヒト霊長類を含む哺乳動物にはどのような病原体が存在するのか、また野生動物由来感染症のブッシュミートを介した感染リスクはどの程度か、という未解明の課題を解決すべく、ガボン共和国における非ヒト霊長類および哺乳動物のブッシュミート検体を用いて、野生動物の保有病原体を網羅的に解析し、人獣共通感染症の感染リスクを明らかにすることを目的としている。さらには、現地研究者の協力の下で、医療保健機関へ感染リスク情報を提供し感染予防対策を提案することも視野に入れている。

3. 研究の方法

(1) ブッシュミート検体に存在する病原体の次世代シーケンサーによる網羅的解析

ブッシュミート検体採取は連携研究機関 IRET と共同で行う。都市部または地方のブッシュミート市場において販売されている合法的に狩猟された非ヒト霊長類あるいは哺乳動物について、狩猟日・狩猟場所・動物種を確認した後、血液・肝臓・腎臓・肺・糞便を採取する。連携研究機関 CERMEC において採取検体から核酸を抽出し、次世代シーケンサー (MiniSeq、イルミナ社) および解析ソフトウェア (CLC Genomics Workbench、CLC Bio 社) により、病原体遺伝子配列を網羅的に同定する。病原体の遺伝子配列解析の一部は長崎大学熱帯医学研究所でも行う。

(2) 病原体遺伝子配列の系統樹解析と病原体の国内侵入経路・年代推定

同定した病原体の系統や他国からの侵入経路・年代を調べるために、(1) で検出した病原体遺伝子配列を用いて最尤法もしくはベイズ法により系統樹を作成する。この解析によりガボン共和国の野生動物に存在する病原体の系統を特定するとともに、病原体がガボン共和国内に侵入してきた経路や年代を推定する。

(3) 狩猟場所と動物種情報、および系統解析結果を総合した疫学的解析

ブッシュミートの狩猟場所・狩猟日・動物種情報と同定された病原体情報から、各病原体の地域性や時期特異性・動物種特異性などを疫学的に解析する。また、(2) の系統解析結果と総合することで、ガボン共和国の野生動物における保有病原体の循環・維持およびヒト感染に有意に関与する環境因子を同定する。

4. 研究成果

本研究では、ガボン共和国において野生動物に存在する病原体を同定するために、まず現地での野生動物検体の採取を行った。野生動物検体採取は2020年3月までは問題なく実施することができたが、新型コロナウイルス感染症の世界的大流行の影響で2020年4月よりガボン共和国への渡航が禁止されたため、2020年4月以降はそれまでに採取した検体の解析に集中することとした。

2019年7月から2020年3月にかけてガボン共和国において野生動物検体採取を行い、合計395検体採取することができた。動物種についてはCytochrome C遺伝子配列をシークエンス解析することで同定した(表1)。

Animal species	Number
Shrews	
Goliath shrew	130
Rodents	
Misonne's soft-furred mouse	133
African pygmy mouse	41
House rat	16
Common rufous-nosed rat	6
Target rat	6
Rusty-bellied brush-furred rat	6
Peters's striped mouse	5
Typical striped grass mouse	3
House mouse	3
Sabuni's brush-furred mouse	1
Bushmeat	
African brush-tailed porcupine	18
Blue duiker	16
Moustached guenon	6
African palm civet	4
African pouched rat	1
Total	395

表1 野生動物種および検体数

Detected Viruses	Animals
Dengue virus serotype 2 (sylvatic)	G
Rotavirus	S
Adenovirus	R, S, D, G, C
Astrovirus	R, P, D
Hepatovirus A	R, D
Hepadnavirus	R, S
Hepacivirus	R
Hepatitis E virus	R
Enterovirus	P, D
Lyssa virus	S
Alpha Coronavirus	S
Adeno-associated virus	G, C

表2 検出した病原ウイルスの例
(動物種: R, Rodent; S, Shrew; P, Porcupine; D, Duiker; G, Guenon; C, Civet)

各個体から血液・肝臓・腎臓・肺・糞便検体を採取し、迅速に超低温冷凍庫に保存した。本研究では最も病原体が多く存在していると考えられる糞便検体を用いてウイルスゲノムを同定することとした。

糞便検体を過去の論文を参考にして処理し(Conceican-Neto et al., Sci Rep, 2015)、抽出した核酸をREPLI-g WTA single cell kit (Qiagen)で増幅し、Illumina DNA Prep kit (Illumina)によりライブラリーを作製した。そのライブラリーを次世代シークエンサーにより解析し、得られたリードをCLC Genomics Workbenchソフトウェア(Qiagen)上でDe Novo Assembly解析およびBLAST解析を行うことでウイルスゲノムを網羅的に同定した。

各動物目ごとに分類し、次世代シークエンサー解析により得られたリード総数、De Novo Assembly解析により得られたコンティグの総数、そしてコンティグ内におけるウイルスゲノム配列の総数を比較したところ、げっ歯類および食肉目に比べて偶蹄目に存在するウイルスゲノム配列数が優位に多かった(図1)。このことから、ブッシュミートの中でもブルーダイカーからのウイルス感染リスクが高くなっていると考えられる。また、検出されたウイルスゲノム配列をBLAST解析した結果、ヒト感染を起こし得る病原ウイルスが多数検出された(表2)。

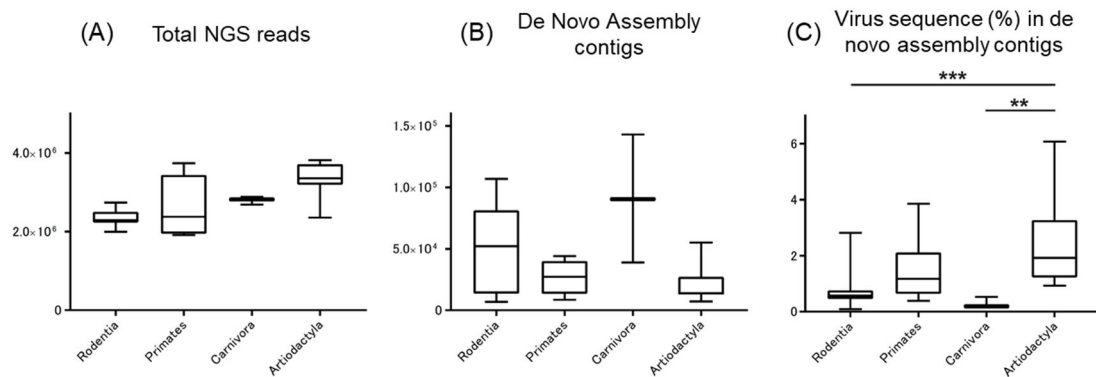


図 1 各動物目における次世代シーケンサー解析により得られたデータの比較。(A)リード数の総計、(B)De Novo Assembly 解析で得られたコンティグ配列の総数、(C)コンティグにおけるウイルスゲノム配列の総数。*** p<0.001、** p<0.01 (ANOVA)。

検出した病原ウイルスの中で、ガボン共和国においてヒト感染が確認されているデングウイルス血清型 2 および A 型肝炎ウイルス (Hepatovirus A) について、得られたウイルスゲノム配列を用いた系統樹解析を行った。世界各国で報告されているウイルスゲノム配列をリファレンスとして MEGA7 ソフトウェア上でアライメントし最尤法にて系統樹を推定した。その結果、本研究にて野生動物より検出されたデングウイルス血清型 2 は森林型に属し、これまでガボン共和国において報告のある都市型のデングウイルス血清型 2 ではないことが明らかになった(図 2)。森林型のデングウイルスは蚊を介してヒト感染を起こすことがあり、動物由来デングウイルスの感染リスクが存在することが示された。

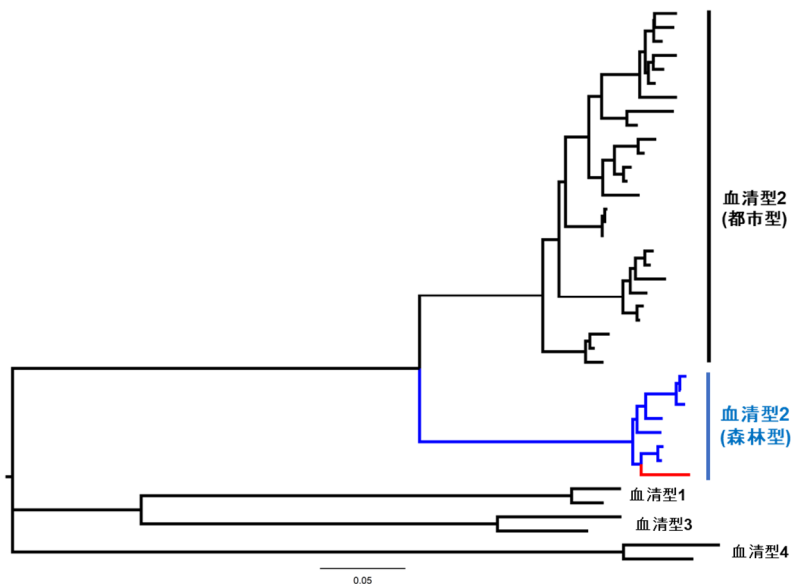


図 2 デングウイルス血清型 2 の系統樹解析。赤：野生動物から検出された株。

また、本研究で検出された A 型肝炎ウイルスは遺伝型 V のサル A 型肝炎ウイルスに近縁であり、ガボン共和国においてヒト検体から検出されている遺伝型 IIA とは異なることが明らかになった(図 3)。サル型の A 型肝炎ウイルスがヒト感染を起こした例は世界的にも報告されていないが、ブッシュミート処理などで直接野生動物に触れることでヒト感染を起こす可能性は十分に考えられる。

以上、本研究ではガボン共和国において野生動物に存在する病原ウイルスを網羅的に同定することに成功した。ブッシュミートの消費量が非常に多いにもかかわらず野生動物を対象とした研究はほとんど行われておらず、本研究成果は、野生動物からの病原ウイルス感染リスクを中部アフリカで初めて示した成果として学術的に意義があるのみならず、ガボン共和国保健省や現地の医療機関へ情報提供することで注意喚起・感染予防に貢献することが期待できる。

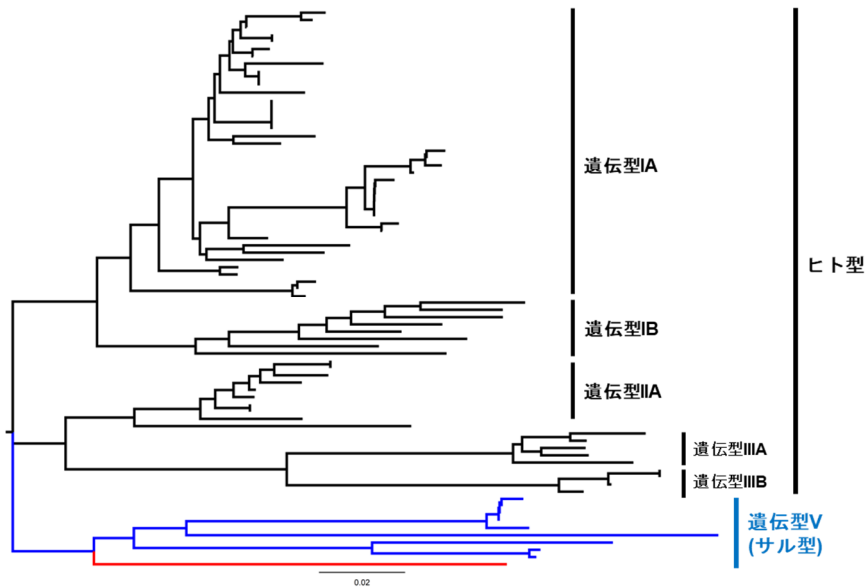


図3 A型肝炎ウイルスの系統樹解析。赤：野生動物から検出された株。

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 Haruka Abe, Yuri Ushijima, Rodrigue Bikangui, Marguerite M. Loembe, Selidgi T. Agnandji, Bertrand Lell, Jiro Yasuda
2. 発表標題 Development of a rapid detection system for arboviruses and dengue virus detection in Gabon
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Abe, Yuri Ushijima, Rodrigue Bikangui, Marguerite M. Loembe, Selidgi T. Agnandji, Bertrand Lell, Jiro Yasuda
2. 発表標題 Phylogenetic analysis of rare genotype of hepatitis A virus detected in febrile patients in Gabon
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
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		
ガボン	ランバレネ医療研究センター	熱帯生態学研究所	