

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590387

研究課題名（和文） 蚊における昆虫ウイルス慢性感染が蚊媒介性ウイルスの感染・流行動態に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effects of latent infection with the insect virus in mosquitoes on propagation and prevalence of the mosquito-borne virus

研究代表者

伊澤 晴彦（ISAWA HARUHIKO）

国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長

研究者番号：90370965

研究成果の概要（和文）：本研究では、野外の蚊集団でしばしば観察される昆虫特異的フラビウウイルスの慢性感染が、後から重複感染した蚊媒介性フラビウウイルスの複製や増殖にどのような影響を与えるかについて解析した。その結果、単独感染の場合と比較して、重複感染した蚊媒介性フラビウウイルスの増殖様態に変化がみられたことから、自然界での蚊媒介性フラビウウイルスの伝播、生態、および蔓延状況に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of latent infections with insect-specific flaviviruses in wild mosquitoes on replication and propagation of mosquito-borne flaviviruses. Growth properties of the mosquito-borne flavivirus varied depending on the presence or absence of the insect-specific flavivirus. This result suggested that latent infections with insect-specific flaviviruses might affect the transmission, ecology, and epidemiology of mosquito-borne flaviviruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	90,000	1,190,000
2011年度	1,000,000	30,000	1,030,000
2012年度	900,000	30,000	930,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	150,000	3,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：ウイルス、感染症、昆虫、社会医学、生態学

### 1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化や交通網のグローバル化に伴い、疾病媒介蚊の分布域や活動期間の延長が予想され、これに伴う蚊媒介性ウイルスの流行拡大が懸念されている。我々は国内外の野外捕集蚊の蚊媒介性ウイルス保有状況調査の過程で、イエカ (*Culex*) 属の蚊から、フラビウウイルス属の新規ウイルス *Culex flavivirus* (CXFV) を分離発見した (Hoshino and Isawa *et al.*, 2007)。解析の結果、CXFV は宿主蚊のみで増殖し、脊椎動物には感染し

ない昆虫特異的フラビウウイルス (insect-specific flavivirus) であることが分かった。さらに、ヤブカ (*Aedes*) 属の蚊からは、CXFV とは異なる新規昆虫フラビウウイルス *Aedes flavivirus* (AEFV) (Hoshino *et al.*, 2009) を発見した。近年世界中の蚊が、これら昆虫特異的フラビウウイルスあるいは非常に近縁なウイルスの潜在感染を受けている事実が次々と明らかになってきた。これらウイルスは、蚊自体には病気を起こさず、自然感染率がかなり高い (数～数十%) のが特徴である。

この事実は、昆虫特異的フラビウイルスが潜在感染している蚊が、吸血により蚊媒介性のフラビウイルスを取り込むことで、蚊個体内での異種フラビウイルスの重複感染が、自然界でかなり頻繁に起こることを示唆している。一般に宿主に複数種のウイルスが感染した場合、一方あるいはその両方の増殖が抑制される現象（干渉）が起こる例が古くから知られている。例えば、イエカにセントリス脳炎ウイルスとウエストナイルウイルス（WNV）を重複感染させると、後から感染したウイルスの増殖が強く抑制されることが報告されている（Pesko and Mores, 2009）。近年、WNV が北米から中米へと大きく拡散しない理由として、イエカに潜在感染する CXFV による干渉が指摘されている（Farfan-Ale *et al.*, 2009）。これまでも、蚊媒介性フラビウイルスの地理的な分布境界（インドを境界とした WNV と JEV の分布、クンジンウイルスの豪州局在）や、媒介可能な蚊や保有宿主が棲息しているながらウイルスは分布・定着しない事例（WNV や黄熱ウイルスの東アジアへの非拡大）が指摘されていたが、その理由については不明であった。我々は、こうしたフラビウイルスの特異な分布生態の背景には、異種フラビウイルス間での干渉作用が強く影響しているのではないかと推察した。そこで、蚊体内で起こる昆虫ウイルスと蚊媒介性ウイルスの共感染において、特に後者の感染動態はどう変化するのか、さらにはウイルスの流行動態や地理的分布との関連性はあるのかについて調べる研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、自然界の蚊集団における昆虫特異的フラビウイルスの慢性感染状態が、後に重複感染した蚊媒介性フラビウイルスの感染動態や宿主蚊（細胞）にどのような影響を与えるかを細胞・個体レベルで解析する。これにより、蚊における昆虫ウイルスの高度慢性感染状態が、蚊媒介性ウイルスの感染増殖や流行動態、宿主蚊の媒介能に及ぼす影響を検討し、その生物学的意義と生態的インパクトを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試ウイルス・蚊・培養細胞

本研究では、昆虫特異的フラビウイルスとしてイエカ特異的な CXFV、およびヤブカ特異的な AEFV を用いた。一方、蚊媒介性フラビウイルスとしては、イエカ媒介性の日本脳炎ウイルス（JEV）およびヤブカ媒介性のデングウイルス（DENV）を用いた。供試蚊としては、コガタアカイエカとヒトスジシマカの実験室飼育システムを用いた。蚊由来培養細胞としては、ヒトスジシマカ由来の C6/36、CCL-126、AeA1-2 各細胞、および本研究で新たに樹立し

たコガタアカイエカ由来培養細胞 NIID-CTR を用いた。

### (2) 昆虫フラビウイルス持続感染細胞の作成および蚊個体への感染

各種蚊由来培養細胞に、CXFV と AEFV をそれぞれ感染させた。これを一定の希釈率のもとで 10 回程度継代培養を続けることで、昆虫ウイルスを安定に保持した持続感染細胞の作出を試みた。細胞のウイルス感染はウイルス特異的配列をプローブとした *in situ* hybridization で確認した。また、コガタアカイエカ雌成虫に CXFV を胸部接種し、感染個体を作成した。一方、AEFV を高率に保有するヒトスジシマカコロニーを選抜した。

### (3) ウイルスの感染動態をモニターするための実験系の構築

昆虫特異的フラビウイルスは細胞障害性が弱いため、プラーク法による力価測定が困難である。そこでウイルス増殖様相をモニターするために、リアルタイム RT-PCR 法によるウイルスゲノムの定量系を構築し、感染細胞上清中に放出されたウイルス粒子由来のゲノム RNA のコピー数の定量を行うこととした。一方、蚊媒介性フラビウイルスに関しては、Vero 細胞を用いたプラーク法により定量した。

### (4) 細胞レベルでのウイルス感染増殖動態の解析

作成された昆虫特異的フラビウイルス持続感染細胞に対し、蚊媒介性フラビウイルスを適当な MOI（感染多重度）で接種した。重複感染後一週間程度まで経時的に回収した培養上清中のウイルス力価をプラーク法により定量した。

### (5) 個体レベルでのウイルス感染増殖動態の解析

イエカ雌成虫に CXFV を胸部接種により感染させ、接種数日後に JEV を人工膜吸血法により経口感染させた。一定期間飼育して血液を消化させた個体を摩砕し、同様にウイルス力価を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 昆虫特異的フラビウイルス持続感染細胞の作成および蚊個体への感染

イエカ特異的な昆虫フラビウイルスである CXFV を、ヒトスジシマカ由来培養細胞 C6/36、および今回新たに作出に成功したコガタアカイエカ培養細胞 NIID-CTR (Kuwata *et al.*, 2012) に接種し、一定の希釈率で複数回の継代を行った。その結果、持続的にウイルス粒子が産生され、双方で継代培養が可能な蚊由来細胞系が作出された。しかし、CXFV 持

続感染 C6/36 細胞については、非感染細胞と比べその形状が変化し（球状化）、付着性が低下しており、また増殖速度も顕著に遅延していた。一方、CXFV 持続感染 NIID-CTR 細胞は、非感染細胞と同様の形態と増殖能を有しており、顕著な変化は認められなかった（不顕性感染）。このため以下の実験には後者の持続感染細胞を用いることとした。CXFV 持続感染 NIID-CTR 細胞に対し、ウイルス特異的配列をプローブとした *in situ* hybridization を行ったところ、ほぼ 100% の細胞が感染していることが確認された。

一方、ヤブカ特異的な昆虫フラビウイルスである AEFV についても、持続感染細胞の作出を試みた。既存の 3 種のヒトスジシマカ由来細胞系（C6/36, CCL-126, AeA1-2）を用いて検討した。これらは、ある一定期間はウイルスを保持しながら維持できたが、最終的には AEFV 感染による細胞障害が顕著になり、細胞の安定的な継代培養は困難であった。また一部の細胞株については、既に AEFV が不顕性に潜在感染している（汚染している）細胞株であることが分かった。このため、本実験に使用可能なウイルスフリーの新規ヤブカ由来培養細胞系の作出を目的として、ヒトスジシマカの初代培養に着手した。すなわち、野外コロニーで AEFV 非感染個体を選抜し、これから得られた産下卵をもとに初代培養を開始した。現時点で細胞株樹立まで至っていないが、有望な細胞集団が複数得られている。

#### (2) ウイルスの感染動態をモニターするための実験系の構築

昆虫特異的フラビウイルスは細胞障害性が弱く、プラーク法によるウイルス力価測定は困難であったため、ウイルスの感染動態をモニターする手段として、リアルタイム RT-PCR によるウイルスゲノム定量系を用いることにした。その結果、CXFV と AEFV における高感度なウイルス定量系が構築することができた。これら昆虫特異的フラビウイルスについて、感染 4 日目の C6/36 細胞培養上清中には約  $1 \times 10^{11}$  コピー/ml のウイルス RNA が含まれることが分かった。なお、この過程で用いた CXFV 株はプラーク純化を經ていないため、遺伝子配列が異なるウイルスが混在している可能性があったが、CXFV の感染性 cDNA クローン由来のウイルスとの間で増殖様態に顕著な差は認められなかった (Isawa *et al.*, 2012)。

#### (4) 細胞レベルでのウイルス感染増殖動態の解析

昆虫特異的フラビウイルス持続感染細胞に対し、重複感染させた蚊媒介性フラビウイルスの感染増殖様相の変化を調べるために、

CXFV が持続感染したコガタアカイエカ培養細胞 NIID-CTR に JEV を接種した。その結果、接種後 4 日目までは、CXFV 非感染細胞との間で JEV の増殖様態や感染細胞の形態に顕著な差はみられなかった。しかし、接種後 4 日目を降から CXFV 持続感染細胞系において顕著な細胞変性効果 (CPE) が確認され、JEV の増殖様態にも変化が認められた。一方で、野外でのコガタアカイエカは CXFV の保有率が比較的低いことが判明しているため、自然界で CXFV の高率な保有が認められている他のイエカ属蚊（ネッタイエカやアカイエカ）を用いたさらなる検討が必要であると考えられた。そこで、本実験に使用可能なコガタアカイエカ以外のイエカ属蚊由来新規培養細胞系の作出を目的とした初代培養を試みている。現時点で細胞株樹立まで至っていない。

一方 AEFV については、前述したように既存のヒトスジシマカ培養細胞を用いた持続感染系の作出は困難であったため、新たなヒトスジシマカ培養細胞系の樹立とこれを用いた AEFV 持続感染系の作出に向けて検討を行っている。

#### (5) 個体レベルでのウイルス感染増殖動態の解析

CXFV をコガタアカイエカ雌成虫に胸部接種し、これを一定期間飼育後、JEV を経口的に取り込ませ、その増殖様相を解析した。その結果、前述の細胞レベルでの結果とは異なり、蚊体内における増殖に顕著な変化は認められなかった。また、前述と同じ理由で、他のイエカ属蚊（アカイエカ等）を用いたさらなる検討が必要であると考えられた。

一方、野外で AEFV を比較的高率に保有するヒトスジシマカコロニーを見出したので、このコロニーの AEFV 保有率を高める選抜を行い、この蚊系統に DENV を重複感染させる実験を検討している。

#### (6) 本研究の位置づけと今後の展望

蚊媒介性ウイルスの自然界での流行動態には、ベクター蚊や保有宿主など、様々な要因が複雑に関係すると考えられる。本研究では、これまでにない視点として「蚊に潜在感染する昆虫ウイルス」に焦点を当てた。宿主に複数種のウイルスが感染した場合、一方あるいはその両方の増殖が影響を受ける現象が知られている。しかし、蚊体内で起こる潜在感染昆虫ウイルスと蚊媒介性ウイルスの重複感染において、特に後者の感染動態はどう変化するのか、さらにはウイルスの流行動態や地理的分布との関連性はあるのか、これまでにほとんど調べられてこなかった。本研究で扱う昆虫ウイルスと蚊媒介性ウイルスは、分類上同属ウイルス（フラビウイルス属）であることから、細胞内での複製や遺伝子発

現機構は共に似通っていると推測され、重複感染下では宿主因子をめぐる競合やウイルス産物による攪乱、あるいは逆に感染増強といった現象が起こる可能性も考えられる。本研究では、重複感染を実験的に検証し、自然界の蚊媒介性ウイルスの感染動態や生態実体を解明することを試みた。我々が世界に先駆けて発見した昆虫特異的フラビウイルスである CXFV と AEFV は、近年世界各地の蚊に広く慢性感染していることが分かってきたが、これらは宿主蚊に明確な病気を起こすことなく増殖し（不顕性感染）、自然界で維持されている。自然下の蚊集団が、なぜ昆虫特異的フラビウイルスに高頻度で慢性感染しているのか、その生物学的意味の解明が期待される。今後、自然界での「蚊—昆虫ウイルス—蚊媒介性ウイルス」の三者間の相互関係を明らかにすることで、特定地域への蚊媒介性ウイルスの侵淫や蔓延についての論理的説明や、流行リスク予測といった実用的な応用につながる科学的知見が得られることが期待される。

#### 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 2 件)

- ① Ryusei Kuwata、 Keita Hoshino、 Haruhiko Isawa、 Yoshio Tsuda、 Shigeru Tajima、 Toshinori Sasaki、 Tomohiko Takasaki、 Mutsuo Kobayashi、 Kyoko Sawabe、 Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae)、 In Vitro Cellular and Developmental Biology — Animal、 査読有、 48 巻、 2012、 369-376 DOI:10.1007/s11626-012-9520-1
- ② Haruhiko Isawa、 Ryusei Kuwata、 Shigeru Tajima、 Keita Hoshino、 Toshinori Sasaki、 Tomohiko Takasaki、 Mutsuo Kobayashi、 Kyoko Sawabe、 Construction of an infectious cDNA clone of *Culex flavivirus*、 an insect-specific flavivirus from *Culex* mosquitoes、 Archives of Virology、 査読有、 57 巻、 2012、 975-979 DOI: 10.1007/s00705-012-1240-z

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小林大介、伊澤晴彦、鎌田龍星、星野啓太、江尻寛子、佐々木年則、小林睦生、糸山亨、太田伸生、沢辺京子、昆虫特異的フラビウイルス *Aedes flavivirus* (AEFV) の伝播様式の解析、第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会

2013 年 3 月 27 日-3 月 29 日、日本大学湘南キャンパス (神奈川県)

- ② 鎌田龍星、伊澤晴彦、星野啓太、佐々木年則、小林睦生、沢辺京子、*Culex flavivirus* 持続感染コガタアカイエカ細胞に対する蚊媒介性フラビウイルスの重複感染、第 47 回日本脳炎生態学研究会、2012 年 5 月 25 日-5 月 26 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本県)
- ③ 小林大介、伊澤晴彦、鎌田龍星、星野啓太、Ngo Dinh Binh、浅野眞一郎、伴戸久徳、佐々木年則、小林睦生、糸山亨、沢辺京子、第 47 回日本脳炎生態学研究会、2012 年 5 月 25 日-5 月 26 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本県)
- ④ 鎌田龍星、星野啓太、伊澤晴彦、田島茂、高崎智彦、佐々木年則、小林睦生、沢辺京子、イエカ属蚊の初代培養、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2011 年 11 月 11 日、国立感染症研究所 (東京都)
- ⑤ 伊澤晴彦、星野啓太、鎌田龍星、高橋(中口) 梓、津田良夫、矢野和彦、小林大介、平尾邦道、糸山亨、Ngo Dinh Binh、浅野眞一郎、伴戸久徳、佐々木年則、小林睦生、沢辺京子、昆虫特異的フラビウイルスの多様性と宿主蚊との関係、2011 年 11 月 11 日、国立感染症研究所 (東京都)
- ⑥ 鎌田龍星、星野啓太、伊澤晴彦、小林睦生、沢辺京子、イエカ属蚊の初代培養、第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2011 年 5 月 20 日-5 月 21 日、金沢白鳥路ホテル (石川県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊澤 晴彦 (ISAWA HARUHIKO)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長  
研究者番号: 90370965

##### (2) 研究分担者

澤邊 京子 (SAWABE KYOKO)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長  
研究者番号: 10215923

油田 正夫 (YUDA MASAO)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 90293779

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: