

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580453

研究課題名(和文) ブラジルのコウモリ由来野外狂犬病ウイルス弱毒株の分子疫学的解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular epidemiology of bat-associated rabies virus isolates in Brazil

研究代表者

酒井 健夫 (SAKAI, Takeo)

日本大学・生物資源科学部・名誉教授

研究者番号：50147667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： ブラジルで流行している狂犬病ウイルス(RABV)のゲノム配列データを用いて分子疫学的解析を行い、以下の結果を得た。

1) FTAカードを用いた分子疫学調査に有用な効率的ウイルスRNA抽出法および保存法を確立した。2) RABVの遺伝的多様性が大きいブラジル北東部においてコウモリ由来狂犬病の分布域および動物間伝播経路を明らかにした。3) ブラジル中央部のフサオマキザルから分離されたRABVは、コウモリ由来RABV系統に大別されたが、既知のコモンマーモセットRABVとは独立したクラスターを形成することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Molecular epidemiological analysis using Brazilian field rabies virus isolates revealed the following results;

1) The useful virus RNA extraction and storage method was established using FTA card. 2) Distribution area and transmission route of the bat-related RABV in the northeastern Brazil were elucidated. 3) Phylogenetic analyses showed that the BRmk1358 strain, isolated from a tufted capuchin monkey in central Brazil, formed a lineage distant from that of marmoset rabies virus within the bat-related rabies virus cluster.

研究分野： 獣医疾病予防学

キーワード： 狂犬病ウイルス 分子疫学 コウモリ 遺伝子解析 ブラジル 野生動物

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は、ブラジルで流行している狂犬病ウイルス (RABV) のゲノム配列を部分的に解読し、得られた配列データを用いて分子疫学的解析を行ってきた。現在、中南米で公衆衛生上および家畜衛生上の課題となっている吸血コウモリをはじめとするコウモリ由来狂犬病の原因ウイルスである RABV は、遺伝子多様性が大きいことが明らかになった一方で、自然界でコウモリが保持している RABV 野外株にはヒトを含めた他の哺乳動物に対して毒力の小さい、いわゆる弱毒株ウイルスが存在している可能性もある。この仮説を証明するために、申請者がこれまでに収集したコウモリ由来 RABV において、宿主に対する病原性に関連することが予測される遺伝子領域を標的にして、重点的な分子系統解析を行い、得られた配列データを基にしてコウモリ間におけるウイルス伝播およびコウモリから家畜など異種動物への伝播を疫学的に解明する必要があった。

2. 研究の目的

- (1) 分子疫学調査に必要な RABV のゲノム RNA 試料を効率的に抽出・保管する方法を確立する。
- (2) コウモリによって媒介されるコウモリ由来狂犬病の感染環を分子疫学的に解明する。
- (3) サルから分離された RABV の性状を分子生物学的および分子疫学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) ブラジルでのコウモリ由来 RABV の採集

これまでの調査実績があるブラジルにおいて、コウモリ由来の RABV の採集を実施した。調査はサンパウロ大学獣医学部の協力を得て、サンプル収集にはコウモリの直接捕獲、害獣駆除および各地診断センターやサンパウロ大学に持ち込まれ、分離・保管された RABV を積極的に利用した。

(2) 脳組織からのウイルス RNA 抽出

RABV のゲノム RNA は、蛍光抗体法およびマウス脳内接種試験によって狂犬病陽性と診断された動物の脳サンプルから直接抽出した。脳乳剤は、脳サンプルの一部をマイクロチューブに移した後に、ペッスルを用いて破碎した。その後、滅菌 PBS で脳乳剤を希釈し、遠心した後に、上清より全 RNA を抽出した。RNA 抽出は、QIAmp Viral RNA Mini Kit を用いて行った。また、ウイルス RNA の抽出・保管条件を検討するために脳乳剤を FTA カードに塗布し、冷蔵・冷凍したものも作製した。

(3) RABV 遺伝子の検出および塩基配列決定

RT-PCR は、SuperScript または One-Step RT-PCR System を用いて行った。RABV の各構造蛋白質遺伝子の増幅には既存のプライマーセットを用いた。RT-PCR サイクルは、RT 反応を 50、30 分間、熱変性を 94、2 分間行った後に、PCR 反応として、熱変性を 94、15 秒間、アニーリングを 50、30 秒間、伸張反応を 68、2 分間の工程を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。上記のワンステップ RT-PCR で増幅が確認されなかった検体は、Nested PCR を行った。増幅産物の確認および PCR 産物の精製は、定法に従って行った。塩基配列は、ダイレクトシーケンスによって決定した。シーケンス反応および反応物の精製は定法に従って行った。解析した遺伝子領域は、N、P、M および G 蛋白質をコードする遺伝子全領域あるいは部分塩基配列であった。

(4) 分子系統解析および相同性の算出

マルチプルアライメントおよび近隣結合合法による系統樹の作成は ClustalX を用いて行った。アミノ酸配列は GENETYX-WIN (Ver. 6.2) によって推定した。塩基およびアミノ酸配列は ClustalW でマルチプルアライメントを行った後に、BioEdit を用いて相同性を算出した。

(5) 分離株のマッピング

検体の地図上へのマッピングは、MapInfo Professional GIS software (ver. 8.0) を用いて行った。ブラジルにおける RABV の地理的分布の解析に用いた地図は、Brasil em Relevô - Embrapa Monitoramento por Satélite (<http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/>) および IBGE Mapas Interativos (<http://mapas.ibge.gov.br/>) から得た。

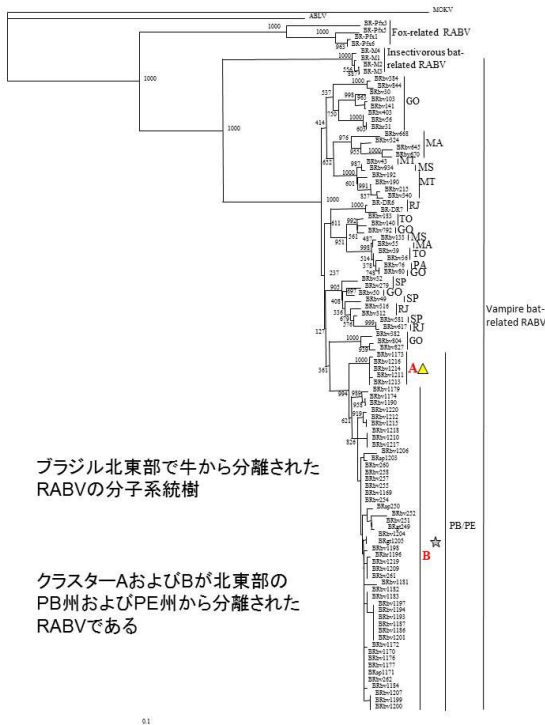
4. 研究成果

(1) 分子疫学調査に有用な効率的ウイルス RNA 保存法の確立

分子疫学研究においては核酸サンプリングが重要である。FTA カードは容易に核酸の保存ができるため、病原体の野外サンプリングに適しているが、RNA サンプルの場合は、FTA カードにおいても保存が難しい。そこで RABV の RNA を用いて FTA カードの最適な使用条件を検討したところ、FTA カードの保存は -20 以下が望ましく、TE バッファーを用いた場合に最も安定的に RNA を回収できることが明らかになった。さらに、回収が困難な RNA サンプルも RNA の溶出時間を延長することによって改善できることが明らかになった (雑誌論文)。

(2) ブラジル北東部の吸血コウモリ由来牛 RABV の分子疫学的解析

ブラジル北東部は、コウモリを含む各種の野生動物やウシなどの家畜において狂犬病が多発し、最も RABV の遺伝子的多様性が大きい地域であると考えられる。したがって、同地域においてコウモリなどの野生動物やその媒介によって狂犬病を伝播される家畜から分離される RABV の分子性状を解析することは、野外におけるウイルス弱毒株の探索にとって有益である。しかし、同地域での RABV の継続的な疫学調査はなく疫学情報は乏しい。そこで、近年、同地域 (PB 州および PE 州) でコウモリを含む野生動物や家畜から分離された RABV の分子疫学的解析を行った。その結果、同地域における RABV の疫学的特徴として、食虫コウモリ由来系統には既知のものとは異なる新たな系統が存在すること、キツネおよび吸血コウモリ由来系統は調査期間を通じて大きな系統の変化が起きていないことが明らかになった。さらに同地域における吸血コウモリ由来 RABV は 1 系統であったため、山脈等の地理的要因によって、他の地域の RABV 系統を保有した吸血コウモリ集団とは隔絶されている可能性が示唆された (雑誌論文)



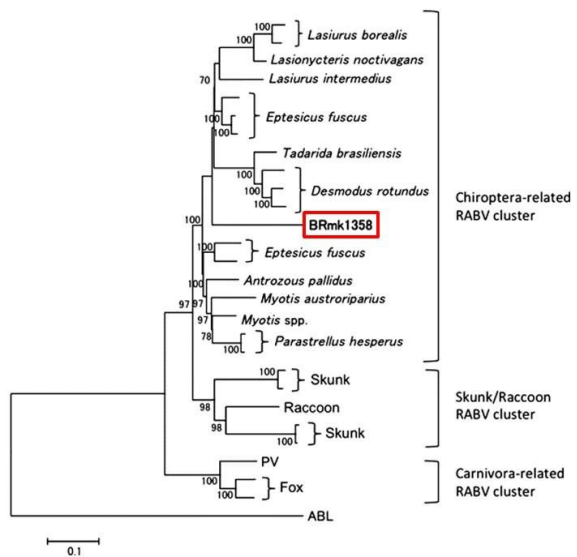
(3) ブラジルのフサオマキザルから分離された RABV の構造蛋白質遺伝子の決定および分子疫学的解析

南米において、サルはヒトへの狂犬病媒介動物として注目されつつあるが、サルの間で RABV の感染環がどのように維持されているかは未解明である。ブラジルの野生のサルにおける狂犬病の分子系統樹解析は、北東部のコモンマーモセットの報告に限られており、野生のサルにおける RABV の感染環は不明で

ある。

2010 年にブラジル中央部の Mato Grosso 州において、ブラジルに広く生息しているフサオマキザル 1 頭が狂犬病を発症し、同サルの脳から RABV が分離された。本研究では、本株 (BRmk1358 株) の塩基配列を決定した。すなわち、BRmk1358 株のゲノムの N, P, M, G および non-coding G-L 遺伝子領域の塩基配列を決定し、分子系統解析を行ったところ、本株はコウモリ由来 RABV のクラスターに大別されたが、既知のコウモリ由来 RABV 系統やブラジル北東部のコモンマーモセットから分離されている RABV 系統とは異なり、独立した系統を形成した。すなわち、フサオマキザルとコウモリの間には RABV の感染環が存在することが示唆されたが、感染源となるコウモリの種類は特定できなかった。また本研究によって、フサオマキザルと既知の報告があるコモンマーモセットでは異なる RABV 感染環を維持していることが明らかになった。野生フサオマキザルの一集団を対象とした RABV の血清疫学調査において、抗体を保有する個体が報告されていることから、本株を含めたサル分離株およびコウモリ由来分離株の継続的な分子疫学調査が必要であると考えられた。

以上、コウモリ間の感染様式を明らかにする目的で、動物やヒトに対して毒力の弱い弱毒ウイルス株を探索し、分子疫学的立場から解明する糸口が確保された (雑誌論文)



ブラジル中央部でフサオマキザルから分離された RABV の分子系統樹

フサオマキザル分離株である BRmk1358 はコウモリ関連 RABV のクラスターに属すが、相同性が高い他の分離株は認められない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Sakai T, Ishii A, Segawa T, Takagi Y, Kobayashi Y, Ito T. Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA cards. J. Vet. Med. Sci. 4, 461-465, 2015, 査読有 DOI:10.1292/jvms.14-0227.

Segawa T, Kobayashi Y, Sase Y, Ito T, Suzuki M, Endoh T, Nakanishi T, Sakai T. Easy-to-use rapid gene amplification method for direct detection of RNA and DNA viruses in sera and feces from various animals. J Virol Methods. 201:31-37, 2014, 査読有 DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.01.019.

Kobayashi Y, Sugimoto K, Mochizuki N, Segawa T, Ito T, Carvalho AA, Nociti DP, Mello RM, Santos AK, Ito FH, Sakai T. Isolation of a phylogenetically distinct rabies virus from a tufted capuchin monkey (*Cebus apella*) in Brazil. Virus Res. 178, 535-538, 2013, 査読有 DOI:10.1016/j.virusres.2013.09.020.

Mochizuki N, Kawasaki H, Silva ML, Afonso JA, Ito T, Ito FH, Sakai T. Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003 - 2009. BMC Res Notes. 16;5:32, 2012, 査読有 DOI: 10.1186/1756-0500-5-32.

〔学会発表〕(計8件)

日下部美帆、小林由紀、Ito FH、酒井健夫、伊藤琢也。ブラジルの吸血および食果コウモリ由来狂犬病ウイルスの分子系統解析。第157回日本獣医学会学術集会 2014年9月10日、北海道大学高等教育推進機構(札幌)

小林由紀、杉本かほり、望月信之、瀬川太雄、伊藤琢也、Carvalho AAB, Nociti DP, Mello RM, Santos AKRA, Ito FH, 酒井健夫。ブラジルのフサオマキザル (*Cebus apella*) から分離された狂犬病ウイルスの分子系統解析。第13回人と動物の共通感染症研究会 2013年11月2日、国立感染症研究所(東京)

佐瀬友紀奈、瀬川太雄、鈴木美和、小林由紀、遠藤智子、伊藤琢也、酒井健夫。抽出作業を省いた簡易・迅速なウイルス遺伝子抽出法の開発。第156回日本獣医学会学術集会 2013年9月20日~9月22日 岐

阜大学(岐阜市)

石井亜矢子、瀬川太雄、小林由紀、伊藤琢也、Ito FH、酒井健夫。狂犬病ウイルス RNA 保存のための FTA カード使用法の最適化。第156回日本獣医学会学術集会 2013年9月20日~9月22日、岐阜大学(岐阜市)

研究分担者の鈴木由紀の研究業績は著者名に旧姓の小林由紀(Kobayashi Y.)を用いている。

〔図書〕(計2件)

Ito T, Markotter W, Nel LH. (Eds. Rupprecht C. and Nagarajan T.) Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 1. 2014, p85-95. Academic Press.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 健夫 (SAKAI, Takeo)
日本大学・生物資源科学部・名誉教授
研究者番号: 50147667

(2) 研究分担者

伊藤 琢也 (ITO, Takuya)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 20307820

鈴木 由紀 (SUZUKI, Yuki)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号: 30712492