

国内捕集蚊から分離されたオルビウイルスの性状解析

研究分担者 伊澤 晴彦（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長）
研究協力者 江尻 寛子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員）
鋤田 龍星（国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員）
津田 良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）
佐々木年則（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）
小林 睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）
澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

研究要旨

国内における節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）感染症の動態を監視する上で、疾病媒介蚊類のウイルス保有状況を把握することは重要である。このため我々は、国内各所で捕集した蚊からのウイルスの分離と性状解析を継続して行ってきた。

2011 年 11 月に東京都内で捕集された蚊からウイルス分離を試みた結果、ヤマトクシヒゲカ雌個体から直径約 70 nm の球状ウイルスが分離され、Koyama Hill virus (KHV) と命名した。KHV のウイルスゲノムは 10 分節の 2 本鎖 RNA であったことから、レオウイルス科オルビウイルス属に属するウイルスと考えられた。そこで、KHV の全分節の塩基配列決定し、コードされるウイルス蛋白質のアミノ配列に基づく分子系統解析を行った結果、蚊媒介性オルビウイルスの一種である Umatilla virus に近縁なウイルスであることが判明した。KHV の増殖特性を調べたところ、蚊由来培養細胞である C6/36 細胞では効率よく増殖し、さらに鳥由来培養細胞の CCL-141 細胞にも感染し増殖可能なことが判明した。また、ウイルス感染実験により、分離源であるヤマトクシヒゲカ体内における増殖性も確認された。本蚊種の吸血源は専ら野鳥であることから、本ウイルスは自然界において、主に蚊と野鳥間の伝播で維持されているアルボウイルスである可能性が示唆された。Umatilla virus の近縁ウイルスについて、東アジア地域における分布が明らかになったのは今回が初めてであり、ヒトや他の哺乳動物への感染性や病原性の有無を含めて、今後詳細な分布実態の把握と疫学的調査が必要である。

A. 研究目的

近年加速するグローバル化や地球規模気候変動に伴い、病原体を媒介する吸血節足動物（ベクター）の発生数の増大や分布域の拡大が予測されている。また生態系の攪乱により、野生動物によるヒトや農作物への被害が年々深刻化してきている。このように、ベクターに刺咬される機会が増加し、人間社会と野生動物間の距離が縮まることで、自然界で保有動物とベクターの間で維持されている

病原体のヒトや家畜への感染機会が増加し、今後新興・再興感染症として勃興してくることが危惧される。

国内における蚊媒介性感染症としては、日本脳炎が毎年発生しており、昨年はデング熱の国内流行が約 70 年ぶりに確認された。近年、国内においてもダニ媒介性の SFTS（重症熱性血小板減少症候群）の発生が顕在化した。このことは自然界には未だ我々が認知していない病原体が少なからず潜伏してい

ることを再認識させるものであった。また同時に、多くの原因不明疾患の中に未知のベクター由来感染症が潜在的に含まれている可能性も示唆している。今後起こり得るベクター由来新興・再興感染症の脅威に備えるためには、平時より媒介節足動物の病原体保有状況と最新の病原体ゲノム情報を把握し、アウトブレイク時の迅速対応につなげていく必要がある。また、保有病原体の生物学的特性や自然界での存在様式（病原性、保有宿主、感染サイクル等）を明らかにすることにより、効果的な予防対策に資する科学的知見の集積を積極的に図っていくことが重要である。

今回、国内におけるアルボウイルスの感染リスクを把握する目的で、東京都内で捕集した疾病媒介蚊のウイルス保有状況調査を実施した。その過程で、国内においてこれまでに報告のないウイルス（レオウイルス科オルピウイルス属）が分離され、詳しいウイルス遺伝子解析と性状解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. ウイルス分離

2011年11月に東京都林試の森公園（目黒区/品川区）において、捕虫網を用いて捕集されたヤマトクシヒゲカを用いてウイルス分離を行った。捕集蚊を20個体1プールとし、培養液（MEM）中で細胞破砕機MM300（QIAGEN）を用いて蚊を破砕し、ウイルス分離用乳剤を調整した。乳剤を蚊由来培養細胞C6/36に接種し、28℃、5% CO₂条件下で7日間培養した。その後、同条件下で2代盲継代培養を行った。

2. ウイルスゲノム解析

分離ウイルスが含まれる細胞培養上清からISOGEN II（ニッポンジーン）を用いてRNA抽出を行った。RT-PCRによりウイルス遺伝子を増幅後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いてウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。

ゲノム両末端配列についてはRACE法またはSPAT法で決定した。塩基配列の解析には、GENETYX-WIN ver.12およびBLASTを利用した。

3. ウイルス粒子の電子顕微鏡観察

ウイルス培養上清を1,600 gで15分間（4℃）遠心後、さらに細胞残渣を除くため、その上層を12,000 gで30分間（4℃）遠心した。調整したウイルス液は超遠心機（Beckman ultracentrifuge, TLS55 rotor）を用いて、77,000 gで2時間（4℃）遠心した。上清を除き、沈澱をバッファーで懸濁後、試料を2%グルタールアルデヒドで固定した。調整された試料は2%酢酸ウラニルによりネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡により、ウイルス粒子形態の観察を行った。

4. ウイルスの分子系統解析

他のオルピウイルスとの類縁関係を推定するため、詳細な分子系統解析を行った。解析には、分離ウイルスならびに既知オルピウイルスのVP1（Pol）、VP2（T2）、VP7（T13）遺伝子のアミノ酸配列を対象に、近隣結合法により行った。

5. 培養細胞における増殖特性の解析

分離ウイルスの宿主範囲や自然生態を解明する目的で、蚊由来C6/36細胞、哺乳動物由来Vero細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）およびBHK-21細胞（ハムスター腎臓由来）、およびCCL-141細胞（アヒル胚由来）でのウイルス増殖性を調査した。各培養細胞にそれぞれウイルスを接種後、それらの細胞培養上清を継時的に回収し、プラーク法あるいはウイルス特異的プライマーを用いた定量的RT-PCRでタイトレーションを行った。

6. 蚊体内における増殖能の解析

分離源蚊種におけるウイルスの増殖能を確認する目的で、野外で捕集したヤマトクシヒゲカ幼虫を実験室内で羽化させ、分離ウイ

ルスの接種試験を実施した。まず、羽化後4～10日後のヤマトクシヒゲカ雌の胸部にウイルス液を接種した。接種7日後の虫体からRNAを抽出し、real-time RT-PCRを用いてウイルスゲノムのコピー数を定量した。

C. 研究結果

今回、ヤマトクシヒゲカから分離されたウイルスを蚊の捕集地にちなみKoyama Hill virus (KHV)と命名した。KHVを接種したC6/36細胞を透過型電子顕微鏡で観察したところ、直径70 nm程度のウイルス粒子が細胞内外で多数確認された(図1a)。また、細胞内においては繊維様の構造物が確認され(図1bおよびc)、細胞膜表面では複数のウイルス粒子が膜状構造物に包まれた様子(pseudo-envelope)も確認された(図1dおよびe)。

KHVのウイルスゲノムは10のセグメントからなる2本鎖RNA(dsRNA)であり、加えて前述のウイルス粒子構造の特徴からも、レオウイルス科オルビウイルス属に属するウイルスであることが強く示唆された。全てのセグメントを合わせたウイルスゲノム配列の全長は19,274塩基対と決定された(表1a)。ウイルスゲノム配列をBLASTxにより解析したところ、本ウイルスはオルビウイルス属のUmatilla virus (UMAV)およびStretch Lagoon orbivirus (SLOV)に近縁であることが示唆された。このことは分子系統解析の結果からも支持された(図2)。本ウイルスとUMAVおよびSLOVの塩基配列およびアミノ酸配列を比較した結果は表1に示した。KHVにおいて特徴的な点として、VP3およびNS1がそれぞれコードされているセグメント3および5において、5'末端の非コード領域の塩基配列と比較したところ、両セグメントともにKHVでは欠損配列があることが判明した(表1b)。

C6/36細胞におけるKHVの増殖様相を調べる目的で、プラーク法によりKHVのウイルス力価を算出した。その結果、KHV感染12時間後にウイルス粒子の放出が始まり、72～96時間後にほぼプラトーに達した。また、Vero、

BHK-21、CCL-141などの脊椎動物由来細胞において同様の感受性試験を実施し、real-time RT-PCRによって培養上清中のKHVのウイルスゲノムを定量した。その結果、Vero細胞およびBHK-21細胞ではウイルス量に特段の変化は認められなかったが、CCL-141細胞では接種後96～144時間後に培養上清中に含まれるウイルスゲノムのコピー数が上昇した。

さらに、蚊におけるKHVの増殖能を調べるために、実験室内で羽化させた野外のヤマトクシヒゲカ個体群の雌個体にKHVを接種した。その結果、KHVを 3.6×10^4 dsRNAコピー当量接種した12個体中5個体において、ウイルスゲノムコピー数の上昇が確認された($1.1 \times 10^7 \sim 4.2 \times 10^9$ dsRNA copies/mosquito)。また、より低濃度の 1.2×10^3 コピー当量接種した12個体中5個体においても、ウイルスゲノムコピー数の上昇が確認された($4.1 \times 10^7 \sim 8.5 \times 10^8$ dsRNA copies/mosquito)。

D. 考察

今回都内の公園で捕集された蚊から、これまでに国内では報告の無いウイルスが分離された。KHVと名付けた本ウイルスは、全ゲノム解析の結果より、以前に米国、インド、イスラエル、豪州で分離報告のある蚊媒介性オルビウイルス種“Umatilla virus”に近縁なウイルスであることが明らかとなった。このウイルスは、これまでに主にイエカ属蚊や野鳥から分離されており、また豪州では家畜等の生産動物において抗体陽性が認められたことが報告されているが、実際の宿主範囲や自然生態についてはほとんど明らかになっていない。本研究により、蚊および鳥類由来の培養細胞でウイルスの増殖が確認されたことから、KHVは自然界では主に蚊と鳥類間の伝播で維持されている可能性が高いと考えられた。現時点で、ヒトや他の哺乳動物に対する感染性や病原性の有無については不明であるが、新興の人獣共通アルボウイルス感染症の備えからも詳細な実態解明が望ま

れる。今後は、国内に生息する野鳥や飼育鳥の KHV の感染（暴露）歴の調査も視野に入れ、ELISA 法等の血清疫学的診断法の確立による分布実態の解明が必要である。一方、KHV の分離源蚊種であるヤマトクシヒゲカの体内において KHV が効率的に増殖できることが確認され、本蚊種が KHV の主要媒介蚊である可能性が高いことが示唆された。今後はヤマトクシヒゲカのウイルス媒介能に関する評価を進めるとともに、他の蚊種の KHV 感受性と媒介能についても検討し、本ウイルスの自然生態を明らかにする必要がある。

本研究で得られた結果は、新興・再興アルボ感染症の対策として、平時より媒介節足動物の病原体保有状況を把握することの重要性を改めて示すものである。

E. 結論

- 1) 2011 年都内の公園で捕集した蚊から本邦未報告の Umatilla virus に近縁な蚊媒介性オルビウイルス Koyama Hill virus (KHV) を分離発見した。
- 2) 蚊および鳥類由来の培養細胞、さらに蚊体内でのウイルスの増殖が確認されたことから、KHV は自然界では主に蚊と鳥類間の伝播で維持されているアルボウイルスであると考えられた。
- 3) Umatilla virus の近縁ウイルスについて、東アジア地域における分布が明らかになったのは初めてであり、ヒトや他の哺乳動物への感染性や病原性の有無を含めて、今後詳細な分布実態の把握と疫学的調査が必要であると考えられた。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwata R., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Kobayashi M., Maeda K., Sawabe K. Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* cells persistently infected with Culex flavivirus. J. Med. Entomol. (In press).

Ejiri H., Kuwata R., Tsuda Y., Sasaki T., Kobayashi M., Sato Y., Sawabe K., Isawa H. 2014. First isolation and characterization of a mosquito-borne orbivirus belonging to the species *Umatilla virus* in East Asia. Arch. Virol. 159: 2675-2685.

2. 学会発表

江尻寛子、鎌田龍星、伊澤晴彦、佐々木年則、津田良夫、林利彦、小滝徹、高崎智彦、小林睦生、沢辺京子（2014）. 国内で捕集された蚊およびマダニから分離された2種のオルビウイルスの性状解析. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2014年5月、山口市

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

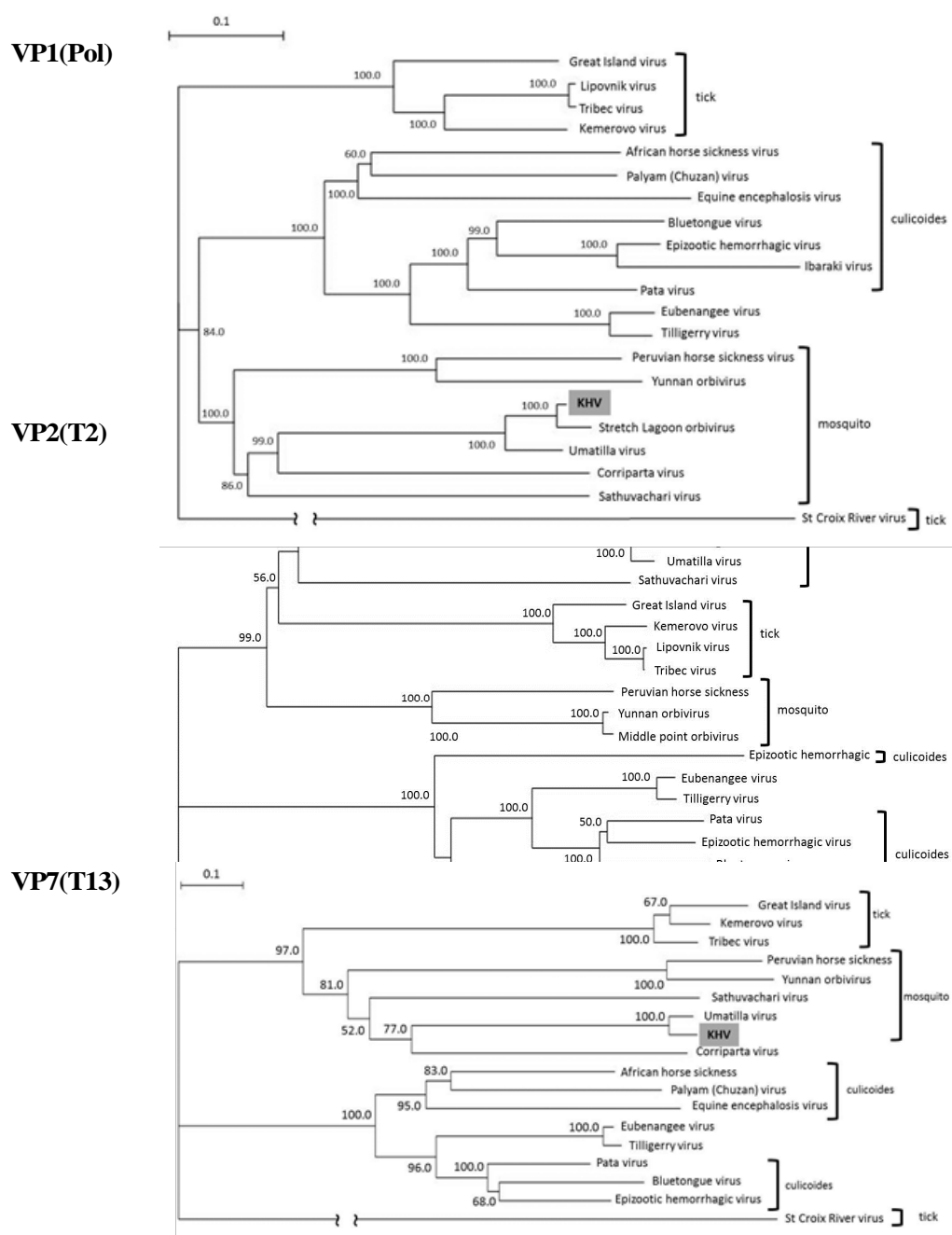


図2 ウイルス蛋白質のアミノ酸に基づく分子系統樹（近接結合法による）