

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究

担当責任者研究報告書

ロスリバーウイルスに対する日本産蚊の感受性と媒介能

分担研究者 江下優樹 大分大学医学部感染予防医学講座 准教授
研究協力者 福田昌子 大分大学医学部感染予防医学講座 助教
Lucky R. Runtuwene 大分大学医学部感染予防医学講座 大学院生
野口香緒里 大分大学医学部感染予防医学講座 大学院生
小林隆志 大分大学医学部感染予防医学講座 教授
Thipruethai Phanitchat タイ国、マヒドン大学熱帯医学部 大学院生
Raweevan Srisawat タイ国、マヒドン大学熱帯医学部 科学者
Narumon Komalamisra タイ国、マヒドン大学熱帯医学部 准教授
森田公一 長崎大学熱帯医学研究所 教授
高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス1部 室長
倉根一郎 国立感染症研究所 副所長

研究要旨

海外からの帰国者がロスリバー熱に感染した症例が報告されたことから、国内に生息する蚊のロスリバーウイルスに対する感受性と媒介能について検討を行った。その結果、日本産ヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに対して感受性であり、媒介能を持つ事が明らかとなった。また、ヤマダシマカとリバーズシマカが本ウイルスに対して感受性であることが胸部接種法で明らかとなった。その中でも、ヤマダシマカは、ヒトスジシマカと同等の感受性があることが示唆された。今回の成績は、ロスリバー熱患者の国内勃発の際に、蚊対策に有用な情報となる。

A. 研究目的

2014年夏期の日本国内でのデング熱の勃発以来、チクングニア熱、ロスリバー熱などのアルボウイルス症の国内への侵入・流行が懸念されている。これらウイルスの主要な媒介蚊として、国内に生息するヒトスジシマカ *Aedes albopictus* があげられる。本蚊種のウイルス媒介能を把握することは、媒介蚊対策を早期に

行い、患者発生を未然に防ぐ方策につながる。

この目的のために、本蚊種のこれらのロスリバーウイルス媒介能を検討した。

国内には、ヒトの生活と接点の多いヒトスジシマカ、ヒトスジシマカに混在して生息するヤマダシマカ *Aedes flavopictus*、および主に九州から沖縄の島々の主に森林内の樹洞内の水たまりで発生するリバーズシマカ *Aedes*

riversi は、いずれも同じ *Aedes (Stegomyia)* の蚊種として分類されている。一般に、*Stegomyia* 亜属の蚊種がデングウイルスを媒介することから、チクングニアウイルスやロスリバーウイルスについても感受性を持つ事が推定されることから、これら蚊種のウイルス媒介能を検討した。

B. 研究方法

1. 材料および方法

供試蚊： 福岡県久留米市で採集した久留米産と東京都渋谷区初台で採集したヒトスジシマカ、長崎県諫早市で採集したヤマダシマカ、鹿児島県奄美大島名瀬市で採集したリバーズシマカおよびリバプール系ネッタシマカ *Aedes aegypti* 雌成虫を使用した。なお、いずれの蚊も実験室内で継代されているものを用いた。

供試ウイルス： チクングニアウイルス (SL11131) は、レユニオン島由来で、患者から分離された株である。国立感染症研究所ウイルス1部の高崎智彦博士から、正式に分与されたものを用いた。実際の使用に際しては、C6/36細胞を使ってストックウイルスを作製して蚊の実験に供した。ロスリバーウイルス [MMNT-78, T48A1p(7dICF)] は、長崎大学熱帯医学研究所の森田公一博士から、正式に分与されたものを使用した。実際の使用に際しては、C6/36細胞を使ってストックウイルスを作成して蚊の実験に供した。

蚊への感染方法： 胸部接種法による感染では、接種装置を用いて、雌蚊の胸側部にウイルス液を接種した。その後、28°Cで飼育して所定日数後に、生存蚊のみをハーベストして、試験まで-80°Cに保存した。また、経口感染法では、① 2 x 2 cm の無菌綿に所定のウイルス液を含ませて、蚊に3日間暴露させる方法、および、② Hemotek 装置を用いた膜 (ブタの腸)

を介してウイルス液を吸液させる方法を行った。なお、②では、吸液時間を1時間としたが、その後3日間は、①の方法に従って同じウイルス液を3日間暴露して感染効率を高めた。

感染させた蚊は、28°Cで14日間飼育を行い、生存蚊のみを-80°Cに保存して、その後の実験に供した。

蚊からの RNA 精製： ペレットミキサーと2%MEM を用いて、個体毎に蚊の乳剤を作製した。その後、低速遠心した上澄み液を原液として、RNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いて蚊から総 RNA を抽出・精製した。

RT-PCR： One-step RT-PCR キット (ライフテクノロジー社) を用いて、蚊の精製 RNA を鋳型にして、RT-PCR をマニュアルに従って実施した。なお、プライマーは、チクングニアウイルスゲノム特異的プライマー、あるいはロスリバーウイルス特異的プライマー配列を感染研の高崎博士から供与を受けた。

(倫理面への配慮)

蚊のウイルス感染実験を行う際は、BSL3 実験室で実施した。実施に際しては、大分大学動物実験委員会から承認を得て開始した。

C. 研究結果

1. 1 ロスリバーウイルスを雌蚊胸部に接種した際の日本産ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーズシマカ、および外国産ネッタシマカの感受性

羽化5~8日後の上記4蚊種の雌成虫胸部にロスリバーウイルスのストックウイルスを約0.25 uL 接種した。28°Cで10日間飼育後の生存蚊から個別に総 RNA を抽出して RT-PCR を行った。その後、アガロース電気泳動で得た結果を Fig. 1a に示した。RT-PCR で予想された増幅産物は100bpであった (Fig. 1a のレーン9)。その結果は、4種の蚊で、ロスリバーウイルス

ゲノムの増幅が確認されたことから (Fig. 1a のレーン 1~8)、いずれの蚊種も本ウイルスに感受性を示すことが示唆された。また、定性的ではあるが、ヒトスジシマカおよびヤマダシマカはリバーズシマカよりもウイルスゲノムの増幅効率が低いことから、細胞の感受性に若干の差があることが推察された (Fig. 1b)。

1. 2 ロスリバーウイルスを経口吸液した日本産ヒトスジシマカ雌成虫の感受性と媒介能

羽化 5~8 日後のヒトスジシマカ初台系の雌成虫にロスリバーウイルスのストックウイルスを経口投与した。Hemotek の膜を介してウイルス液を吸液する機会を 1 時間与えた。その後、ウイルス液を含む綿を介して吸液の機会を 28°C で 3 日間与え続けた。飼育は 1 日 16 時間照明の 28°C の恒温槽内で、4% 砂糖水を与えながら 14 日間飼育した。14 日経過後の生存蚊は、-80°C に保存したのちに、個別毎に脚を除いた組織から総 RNA を抽出して RT-PCR を行った。

アガロース電気泳動で得た結果を Fig. 2a に示した。RT-PCR で予想された増幅産物は 100bp であった (Fig. 2a のレーン 7)。ウイルス液単体を吸液した 3 個体の蚊 (Fig. 2a のレーン 1, 2, 3) あるいは、ウイルス液にアデノシン二リン酸を加えた液を吸液した 2 個体の蚊 (Fig. 2a のレーン 4, 5) のうち、それぞれ 1 個体からロスリバーウイルスゲノムの増幅が認められた (Fig. 2a のレーン 2 と 5)。このことから日本産のヒトスジシマカは経口感染で本ウイルスに感受性があることが明らかとなった。また、個体数は少ないが、ウイルス液にアデノシン二リン酸を加えた液と加えない液とで、蚊から検出されるウイルスゲノムはほぼ同等と推定された (Fig. 2b)。

次に、Fig. 2a でウイルスゲノムが検出された個体の脚から抽出・精製した総 RNA を鋳型として、ロスリバーウイルス特異的プライマーを

用いて RT-PCR を行った。その結果、いずれの個体の脚からも本ゲノム陽性のバンドが電気泳動で検出された (Fig. 3a)。このことから、中腸細胞で増殖したロスリバーウイルスは蚊の体腔内に放出されて、全身に拡散していることが推察され、唾液腺にも本ウイルスは到達していると想像される。また、脚から抽出したウイルスゲノムと脚以外から抽出したそれらの増幅程度を比較したところ、若干増幅程度は低い、ほぼ同程度の増幅であった。

D. 考察

日本産のヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに感受性があり、ウイルスを媒介する可能性が今回の実験で示唆された。

今回の胸部接種法による実験から、ヤマダシマカ、リバーズシマカに本ウイルス感受性があることが明らかとなった。両蚊種の媒介能を検討するためには、経口感染実験を今後検討する必要がある。

同じヒトスジシマカ群に属するヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、及びリバーズシマカでは、いずれもウイルスの増殖は認められるが、リバーズシマカでは増殖が若干低いように思われた。今後、例数を増やす必要がある。

E. 結論

(1) 日本産ヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに対して感受性であり、媒介能を持つことが明らかとなった。

(2) ヤマダシマカとリバーズシマカが本ウイルスに対して感受性であることが胸部接種法で明らかとなった。

(3) 日本産ヒトスジシマカとヤマダシマカの本ウイルス増殖効率は、ほぼ同程度であり、リバーズシマカのそれは若干低いことが胸部接種法の結果から示唆された。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Lucky Ronald Runtuwene, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014): Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse Parasit Vectors, 7:143. doi:10.1186/1756-3305-7-143

(2) Lucky Ronald Runtuwene, Kaori Noguchi, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Kenta Nakai and Yuki Eshita (2014): Vector competence of *Aedes aegypti* to dengue virus. Urban Pest Management 4(1) : 1-14.

(3) Junya Yamagishi, Anna Natori, Mohammed E.M. Tolba, Arthur E. Mongan, Chihiro Sugimoto, Toshiaki Katayama, Shuichi Kawashima, Wojciech Makalowski, Ryuichiro Maeda, Yuki Eshita, Josef Tuda and Yutaka Suzuki (2014): Interactive transcriptome analysis of malaria patients and infecting *Plasmodium falciparum*. Genome Res., 24: 1433-1444,

(4) Jąkalski, Marcin; Wakaguri, Hiroyuki; Kischka, Tabea; Nishikawa, Yoshifumi; Kawazu, Shin-ichiro; Matsubayashi, Makoto; Kawahara, Fumiya; Tsuji, Naotoshi; Cao, Shinuo; Sunaga, Fujiko; Xuan, Xuenan; Okubo, Kazuhiro; Igarashi, Ikuo; Tuda, Josef; Mongan, Arthur; Eshita, Yuki; Maeda, Ryuichiro; Makalowski, Wojciech; Suzuki, Yutaka; Yamagishi, Junya (2014) : DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic

data for apicomplexan parasites. NAR-02635-Data-E-2014.R1 Nucleic Acid Res., 42(1):D123-131.

2. 学会発表

(1) 江下優樹, 福田昌子, Lucky Runtuwene, 大塚 靖, 野口香緒里, 川上絵理, 徳永暁憲, 小林隆志, 服部正策, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, 牛島廣治, 倉根一郎, 高崎智彦 (2014) : 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊 2 種のチクングニアウイルス感受性(2)。第 66 回日本衛生動物学会大会、2014 年 3 月 21 日(金)・22(土)・23(日)、岐阜大学地域科学部、岐阜県岐阜市。Med. Entomol. Zool., 65 (大会特集号) :45, 2014

(2) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014) : Utilization of CCL-125 for analyzing innate immunity in *Aedes aegypti*. 第 66 回日本衛生動物学会大会、2014 年 3 月 21 日(金)・22(土)・23(日)、岐阜大学地域科学部、岐阜県岐阜市。Med. Entomol. Zool., 65 (大会特集号) :46, 2014

(3) 三井マルセロ孝弘、藤田直子、宇佐川佑子、田村寛子、岩田敦子、岸 健志、江下優樹、小林隆志、西園晃、門田淳一(2014) : 病初期の IgM 迅速検査で陰性であった Dengue 熱の 1 例。第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会、第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 84 回日本感染症学会西日本司法界学術集会合同開催。2014 年 10 月 23 日(木)~25日(土)、岡山コンベンションセンター、岡山市。合同開催プログラム・抄録集 2014: 378. (抄録番号 234)

(4) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 小西英二, 山中敦史, 牧野芳大, 野口香緒里, 川上絵理, 福田昌子, 小林隆志, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 山岸潤也, 鈴木 穰, 中井謙太, 前田龍一郎, 杉本千尋, 倉根一郎, 高崎智彦 (2014): 一過性的にデングウイルス血症をマウスに起こして、定量的感染蚊を大量に作る新規の方法。第35回都市有害生物管理学会大会・総会、2014年6月27(金)・28(土)、日本大学生産工学部、千葉県習志野市。

(5) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Junya Yamagishi, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Yuki Eshita and Takashi Kobayashi (2014): Potential novel anti-dengue virus in *Aedes aegypti* mosquito. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Pacifico Yokohama, Kanagawa Prefecture, November 25-27, 2014, MBSJ 2014 Program: 112. (Poster # 1P-0015)

(6) 岩中 愛, 松原祥恵, 福田昌子, Thipruethai Phanitchat, Raweewan Srisawat, Lucky R. Runtuwene, 野口香緒里, Arthur E. Mongan, 鈴木 穰, Narumon Komalamisra, 成田弘成, 森田公一, 倉根一郎, 高崎智彦, 林田京子, 杉本千尋, 小林隆志, 江下優樹 (2014): RT-LAMP 法の改良によるアルボウイルス症診断の検討。第26回日本環境動物昆虫学会年次大会、長崎大学教育学部、長崎市、11月29日(土)、30日(日)、第26回日本環境動物昆虫学会年次大会プログラム集 P-11。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

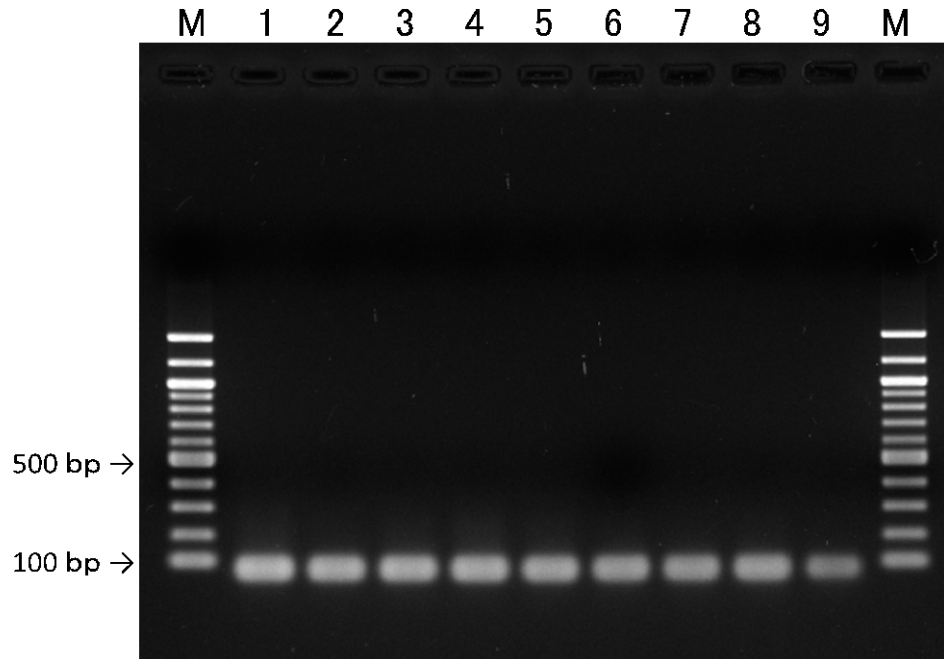
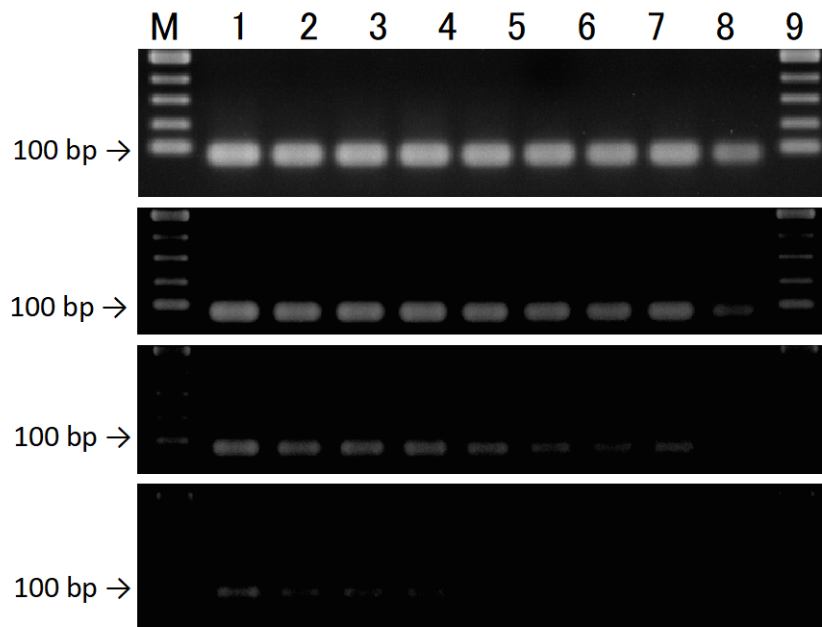


Fig. 1a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of intrathoracically Ross River virus-inoculated mosquitoes 10 days post infection at 28C.
(M: 100 bp ladder marker, lanes 1-2: *Ae. albopictus* (Kurume), lanes 3-4: *Ae. flavopictus* (Nagasaki), lanes 5-6: *Ae. riversi*, lanes 7-8: *Ae. aegypti*, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (141216-141226)
(1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)



Ae. albopictus > *Ae. flavopictus* > *Ae. riversi*

Fig. 1b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of intrathoracically Ross River virus-inoculated mosquitoes 10 days post infection at 28C.
(M: 100 bp ladder marker, lanes 1-2: *Ae. albopictus* (Kurume), lanes 3-4: *Ae. flavopictus* (Nagasaki), lanes 5-6: *Ae. riversi*, lanes 7-8: *Ae. aegypti*, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (141216-141226)
(1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

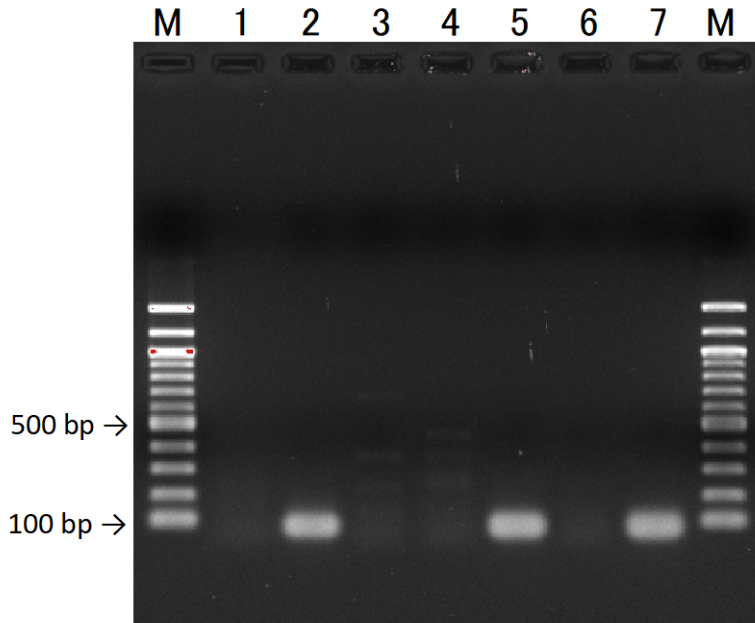


Fig. 2a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquitoes w/o legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).
 (M: 100 bp ladder marker, lanes 1-5: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lanes 1-3: RRV alone, lanes 4-5: RRV and Adenosine diphosphate (final concentration : 0.077 M) and lane 6: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

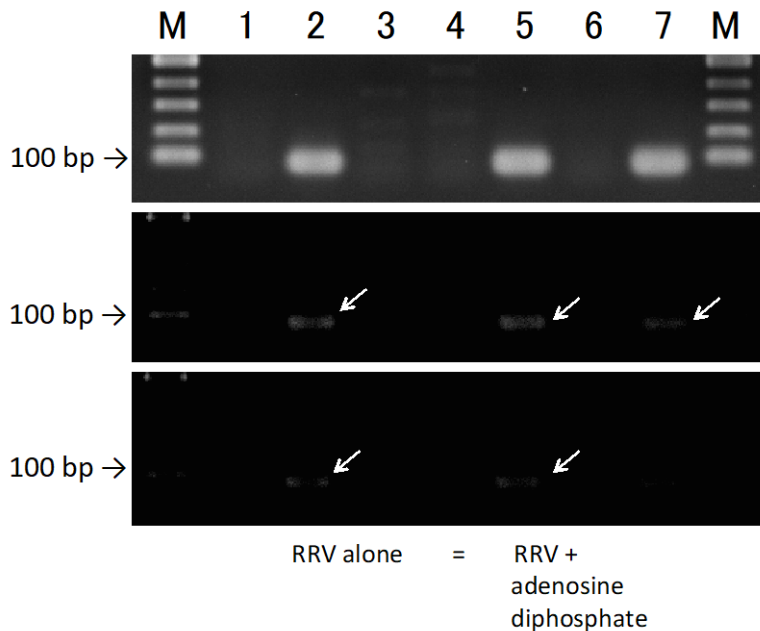


Fig. 2b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquitoes w/o legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).
 (M: 100 bp ladder marker, lanes 1-5: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lanes 1-3: RRV alone, lanes 4-5: RRV and adenosine diphosphate (final concentration : 0.077 M) and lane 6: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

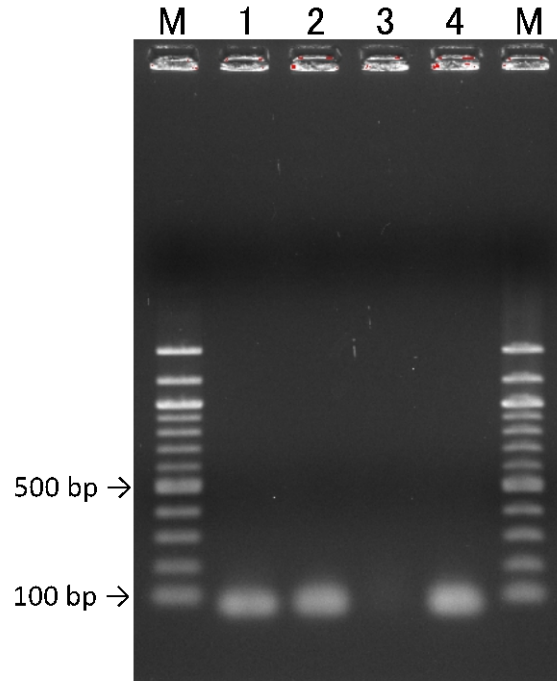


Fig. 3a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquito legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).

(M: 100 bp ladder marker, lanes 1 & 2: *Aedes albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lane 1: RRV alone, lane 2: RRV and 0.077 M adenosine diphosphate, and lane 3: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 4: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

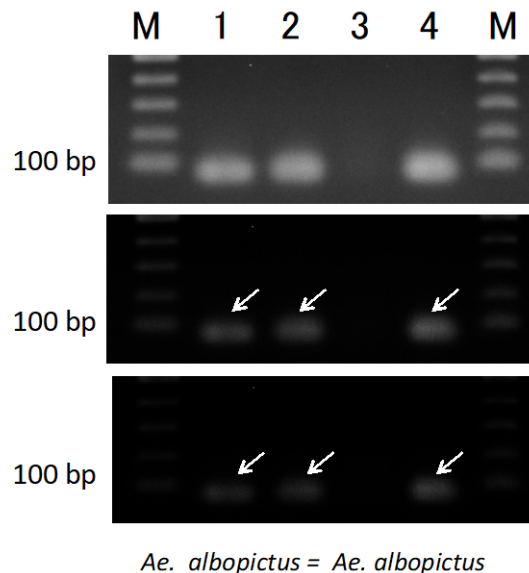


Fig. 3b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquito legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).

(M: 100 bp ladder marker, lanes 1 & 2: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lane 1: RRV alone, lane 2: RRV and 0.077 M adenosine diphosphate, and lane 3: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 4: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)