

令和6年度総括研究報告書
厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
「新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」

分担研究報告書
蚊のウイルス保有実態と蚊媒介性ウイルスの感染・流行リスク解析

研究分担者	国立感染症研究所	昆虫医科学部	小林 大介
研究協力者	国立感染症研究所	昆虫医科学部	澤田 恵子
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	犬丸 瑞枝
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	比嘉由紀子
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	葛西 真治
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	伊澤 晴彦

研究要旨 本邦には、土着している可能性がありながら、詳しい生態が未解明な昆虫媒介性ウイルスが数多く存在し、そのなかには感染したヒトでウイルス血症を引き起こすもの、またはその可能性が高いものが複数存在している。本研究では、このようなウイルスに着目し、これらウイルスの感染リスクならびにその流行実態を明らかにするために、血液製剤の安全性確保に資する知見を得ることを目的とした。今年度は南西諸島において、ウイルス媒介昆虫類の捕集を実施し、蚊やヌカカ、サンショウバエなど多種多様な吸血昆虫類が吸血のため牛舎に飛来していることが明らかとなった。また、フクオカウイルスを媒介する蚊種を特定するべく、複数種類の蚊由来培養細胞におけるウイルスの増殖動態を調査した。その結果、フクオカウイルスは実験に供試した4属5種の蚊に由来する8種類の培養細胞の全てにおいて、ウイルスの感染・増殖性が確認された。

A. 研究目的

我が国では、これまでに十数種の蚊媒介性ウイルスが記録されている。そのうち、日本国内に土着して毎年流行していることが確認されているのは日本脳炎ウイルスのみである。それ以外のウイルスについては、例えばデングウイルスのように、国内には定着していないが、輸入症例などを感染源として国内流行が散発的に発生するものも知られている。しかしながら、国内に土着している可能性がありながら、ほとんど調査がされていないウイルスも数多く存在し、そのなかにはヒトでウイルス血症を引き起こすもの、またはその可能性が高いものも存在している。

本研究では、前述のような国内に土着している可能性があり、かつヒトでウイルス血症を引き起こす（またはその可能性が高い）ウイルス、具体的にはペリブニヤウイルス科やラブドウイルス科などに分類されるウイルスを研究の対象とする。これらのウイルスについて、日本国内で捕集された蚊からのウイルス遺伝子検出ならびに培養細胞を用いたウイルス分離を行い、国内に生息する蚊類における当該ウイルスの保有実態を調査する。さらに、ウイルスの分離株を用いた蚊への感染実験によって、ウイルス媒介可能性のある蚊種についても調査することで、我が国におけるこれらウイルスの感染と流行リスクを解析する。

B. 研究方法

南西諸島における吸血昆虫の採集

2024年10月18～21日に沖縄県八重山郡竹富町西表島において、吸血昆虫類の捕集調査を行った。島内の複数の牛舎にブラックライトトラップ（John W. Hock 社）を設置し、午後5時前後から翌朝午前6時前後までブラックライトとファンを稼働させ、吸血のために飛来する昆虫類の捕集を実施した。

ウイルスの準備

本研究に使用したフクオカウイルス [Fukuoka virus (FUKV)] FUK-11 株は、HmLu-1 細胞（ハムスター肺由来）に接種し、細胞変性効果が認められた後に培養上清を回収し、以降の実験まで-80℃で保存した。

蚊由来培養細胞

本研究には以下に示す4属5種の蚊に由来する8種類の蚊由来培養細胞を用いた；AeAe-GH98 細胞（ネッタイシマカ由来）、Ar-3（オオクロヤブカ由来）、C6/36 細胞（ヒトスジシマカ由来）[JCRB 細胞バンクおよび European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) 由来株]、CCL-126 細胞（ヒトスジシマカ由来）、MSQ43 細胞（ステフェンスハマダラカ由来）、NIAS-AeA1-2 細胞（ヒトスジシマカ由来）、NIID-CTR（コガタアカイエカ由来）細胞。C6/36 細胞、CCL-126 細胞、MSQ43 細胞はイーグル最少必須培地、NIAS-AeA1-2 細胞は IPL-41 昆虫培地、AeAe-GH98 細胞はシュナイダー培地、Ar-3 細胞、NIID-CTR 細胞は VP12 培地を用い、それぞれの培地に非働化したウシ胎児血清や抗生物質等を添加して、細胞維持培地とした。これらの培養細胞は、28℃もしくは25℃

にて維持・培養した。

FUKV RNA の定量的リアルタイム PCR 系の作製

FUKV ゲノムの L 遺伝子領域上に蛍光プローブおよび検出プライマーセットを設計した。スタンダード RNA は、この領域を含むように設計したプライマーセットにより合成した cDNA から、mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transcription Kit (ThermoFisher Scientific 社) により作製した。

各種細胞における FUKV の増殖動態の観察

上述した 8 種類の蚊由来培養細胞および HmLu-1 細胞における FUKV の増殖動態を解析するため、 3.0×10^5 の各種細胞に対し、 3.0×10^7 RNA コピーの FUKV を接種した。接種 1 時間後に各種の細胞を、PBS で 2 回洗浄し、細胞培養液を添加した。その後すみやかに 150 μ L の培養上清を回収するとともに、接種 48 時間および 120 時間後にも同量の培養上清を回収し、以降の解析まで -80°C で保存した。

培養上清からのウイルス RNA の抽出は、NucleoSpin RNA Virus (タカラバイオ社) を用いて実施した。抽出された RNA は、上述の定量的リアルタイム PCR 系により Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs 社) を用いて、FUKV RNA のコピー数を測定した。

C. 研究結果

南西諸島の畜舎に飛来する吸血昆虫類の発生状況

沖縄県八重山郡竹富町西表島内で選定した 4 つの畜舎 (牛舎) にブラックライトトラップを設置し、日没後から翌朝までに吸血に飛来する昆虫類の捕集を行った (図 1)。2024 年 10 月 18~21 日の調査期間内の 3 晩における調査によって、千頭以上の吸血昆虫類 (蚊、ヌカカ、サシチョウバエ等) が捕集された (図 2・3)。現在、これら昆虫類の分同定作業を実施しており、順次、保有ウイルスの解析を実施する予定である。

各種蚊由来培養細胞における FUKV の増殖動態解析

FUKV を接種した各種蚊由来培養細胞の培養上清を経時的にサンプリングし、そこに含まれるウイルス RNA 量を定量した。その結果、今回実験に用いたすべての蚊由来培養細胞の上清において、経時的な FUKV RNA 量の増加が観察された (図 4)。このことから、FUKV はこれら多様な蚊種の細胞に感染し、増殖可能であることが示された。また、これらの蚊由来培養細胞のいずれにおいても、顕著な細胞変性効果は観察されなかった。今回実験に使用した蚊由来培養細胞のうち、ウイルス接種 120 時間後において最も高いウイルス RNA コピー数が観察された

のは C6/36 細胞 (JCRB 細胞バンク由来) であり、次いで MSQ43 細胞であった (図 4)。

D. 考察

本研究では、我が国に常在するもしくはその可能性がありながらも、流行状態が詳しく判明していない蚊媒介性ウイルスの実態を明らかにするとともに、実験室内におけるウイルスの感染実験を行うことによって、それらウイルスの感染リスクを明らかにすることを目的としている。今年度は、野外における吸血性節足動物の採集調査ならびに、実験室において様々な蚊由来培養細胞を用いて、ウイルスの増殖動態解析を実施した。

我が国に土着している可能性がある蚊媒介ウイルスのなかで、ヒトでウイルス血症を引き起こしかつ病原性が報告されているウイルスはバタイウイルス [Batai virus (BATV)] のみである。国内では BATV のヒト症例は未だ報告されていないものの、1994 年および 2001 年にそれぞれ宮古島と与那国島のウシの血液から BATV が分離されている。この事例が示すように、南西諸島では何らかの蚊が現地のウシに BATV を媒介したと考えられるが、当該地域における BATV 媒介蚊やその後の流行状況についての情報はない。そこで今回、南西諸島の牛舎に飛来する吸血昆虫類の捕集調査を実施した。今回の調査では、吸血昆虫類として多数の蚊およびヌカカが牛舎に設置したトラップで捕集され、これらの吸血昆虫がウシを吸血するために飛来していることが確認された。今後はこれら吸血昆虫種の分類同定を行うとともに、ウイルス分離等を行うことによって、BATV を含めた保有ウイルスの解析を実施する予定である。

今回の調査において、上述の牛舎に設置したトラップでサシチョウバエの一種の雌成虫も捕集された (図 3)。今回の調査地である西表島には、イリオモテサシチョウバエ *Sergentomyia iriomotensis* の分布が報告されている。今回採集されたサシチョウバエについては、未だ種の同定は行われていないが、おそらく本種であることが推定される。イリオモテサシチョウバエは、自然界では専ら爬虫類などの冷血動物を吸血すると考えられており、ウシを含む哺乳動物を吸血源として利用することは報告されていない。また、これまで牛舎における採集記録も存在していない。本研究による牛舎での採集記録は、本種がウシを吸血するために牛舎に飛来した可能性を示すものであるかもしれない。本邦に分布するサシチョウバエ種の吸血生態を解明するうえで重要な一知見であると考えられる。

本研究では、本邦に常在性でヒトに感染

しウイルス血症を起こす可能性のある FUKV の媒介蚊を特定するべく、各種蚊由来培養細胞を用いたウイルスの増殖動態解析を実施した。その結果、FUKV は実験に用いた 4 属 5 種の蚊に由来する 8 種類の培養細胞の全てにおいて、感染・増殖性が確認されたことから、広範な蚊種の細胞に感染し増殖可能であることが明らかとなった。FUKV はこれまで本邦のコガタアカイエカから分離された報告があるものの、今回実験に用いた蚊由来培養細胞のうちで、当該蚊種の培養細胞上清中のウイルス RNA コピー数は最も低い結果であった。その一方で、ヒトスジシマカやステフェンスハマダラカに由来する培養細胞においては、コガタアカイエカ由来培養細胞よりも 100 倍程度高い FUKV の増殖性が観察されたことから、これらの蚊種が FUKV の好適な媒介蚊である可能性も考えられる。そのため今後は、これらの蚊種を含めた各種の蚊個体に FUKV を接種することによって、ウイルスの媒介性を解析することを予定している。

E. 結論

南西諸島では多数の吸血昆虫が吸血のため牛舎に飛来していることが確認された。また、FUKV は広範な蚊種由来の細胞に感染し増殖することが確認された。血液製剤の安全性を確保するためには、国内に土着するウイルスの流行実態ならびに感染リスクを把握することが重要であり、今回得られた結果を基に、さらなる研究を遂行する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 特記事項なし

学会発表

1. 特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし



図 1：牛舎に設置したブラックライトトラップ



図 2：ブラックライトトラップで捕集された多数の吸血昆虫類

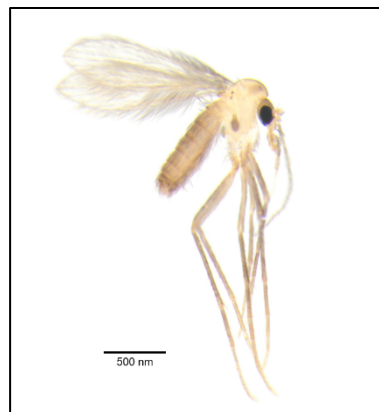


図 3：牛舎に設置したブラックライトトラップで捕集されたサシチョウバエの一種

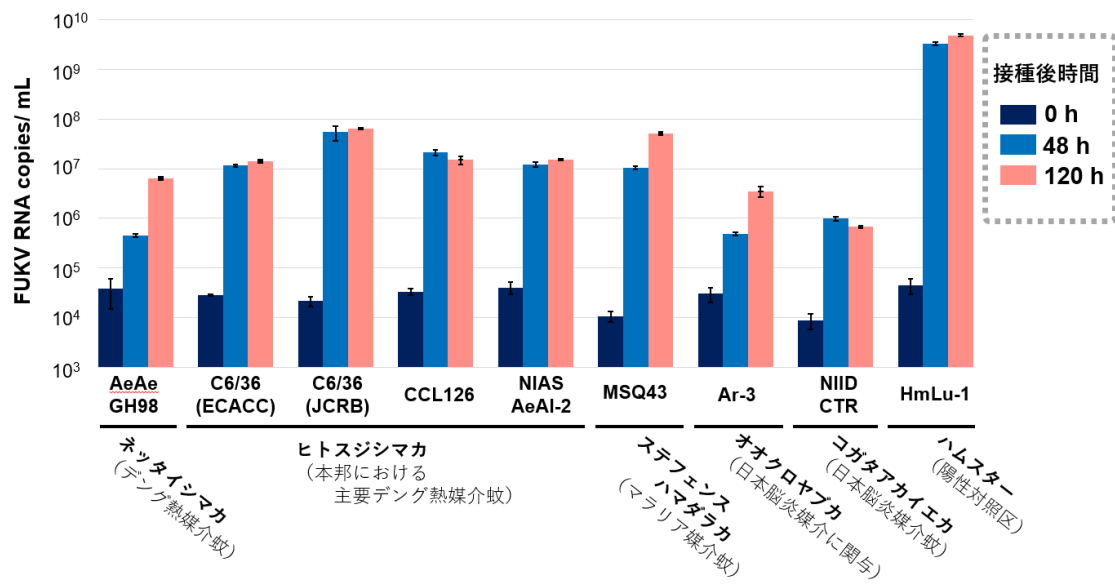


図 4：各種蚊由来培養細胞におけるフクオカウイルスの増殖動態