

2024 年 5 月 7 日

培養困難なマダニ由来フラビウイルスの解析技術を開発

－動物間の流行状況を調査する手掛かりに－

研究成果のポイント

➤ウイルスを網羅的に検出する手法と感染性偽ウイルス粒子（注 1）を用いた調査手法を組み合わせることによって、これまで詳しい研究が困難であった難培養性フラビウイルスの解析が可能となった

➤今回発見された新種のサルヤマウイルスは、従来の方法では分離・培養（注 2）することができなかったが、取得されたウイルスの遺伝子配列をもとに感染性偽ウイルス粒子の作製に成功し、これを用いた野生動物の血清疫学調査によって、本ウイルスが日本国内に広く分布している可能性が示された

➤この方法を用いることによって、培養が困難なために病原体としてこれまで認知されていなかったウイルスや、未知のウイルスの詳しい生態・疫学調査が可能になるとと思われる

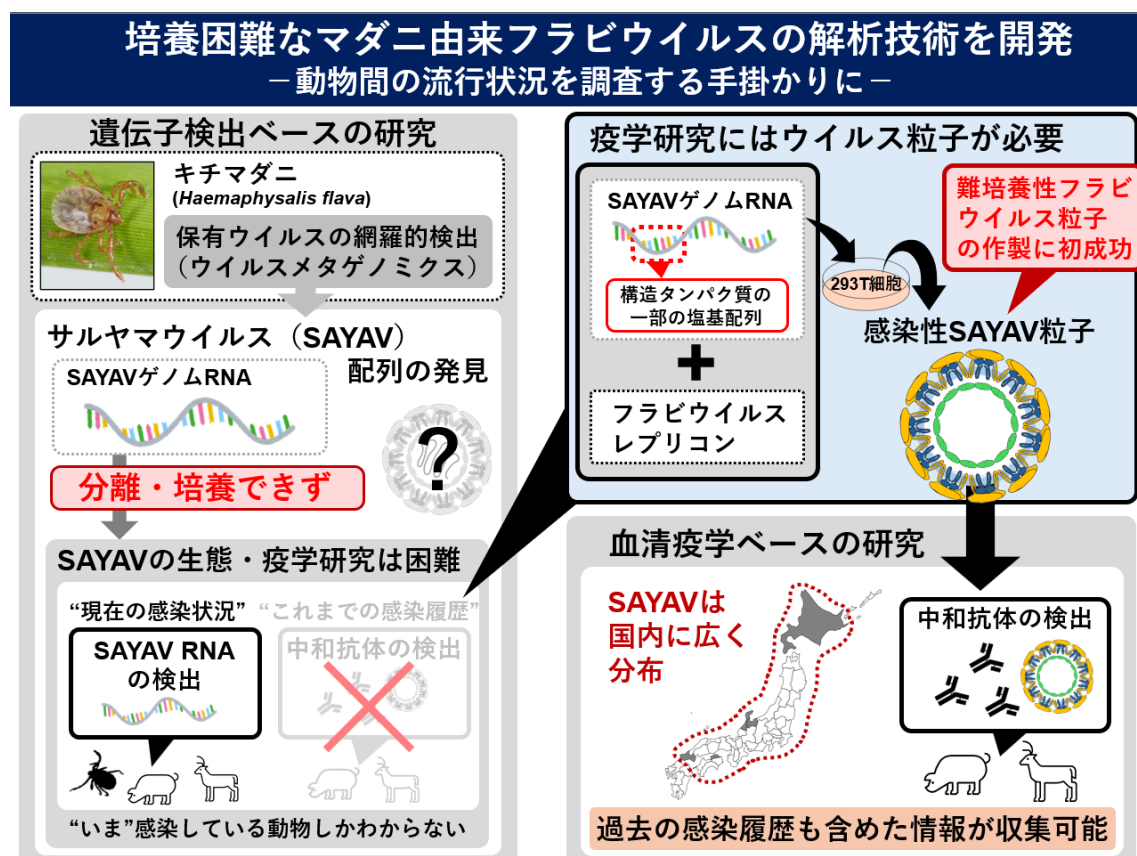
摘要

国立感染症研究所昆虫医科学部の小林大介 主任研究官、国立感染症研究所獣医科学部の井上雄介 研究生（現・研究員）、国立感染症研究所ウイルス第二部の鈴木亮介 室長らのグループは、ウイルスを網羅的に検出する手法によって、国内に分布するキチマダニ（吸血性ダニの一種）から新種のウイルスであるサルヤマウイルスを発見しました。サルヤマウイルスは遺伝子解析によりデング熱や黄熱などの重要な感染症を引き起こすフラビウイルス（注 3）と近縁なウイルスであることはわかりましたが、従来の手法では分離・培養（注 2）が難しく、血清疫学調査をはじめとする流行動態の調査が困難でした。そこで、得られたウイルスの遺伝子配列から、本来のウイルスと非常に似た構造を示す感染性偽ウイルス粒子（SRIP）（注 1）を作製し、これを抗原として日本各地のニホンジカとイノシシの血清に対し中和試験（注 4）を行いました。その結果、日本の広い範囲でニホンジカとイノシシに感染履歴があることがわかりました。本研究はサルヤマウイルスの流行動態の解明に一石を

投じるとともに、分離・培養が難しいウイルスであっても、流行動態の理解が可能であることを実証しました。

マダニは、これまで病原体として認知されていないウイルスを含め、多種多様なウイルスを保有していることがわかっています。しかし、そのウイルスの多くは分離・培養が困難であり、詳細なウイルス性状の解析や疫学的な研究が行われていません。そのため、ヒトや動物への感染性や病原性、流行状態についてはほとんどが不明です。本研究のアプローチは、今後、培養が難しい特性によって未だ病原体として認知されていないウイルスや、未知のウイルスの生態の解明や疫学調査への応用が期待されます。

本研究は、国際科学雑誌『Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)』（令和6年4月30日付）に掲載されました。



背景と概要

次世代シーケンサー（NGS）を用いた最近の網羅的なウイルス研究により、節足動物は極めて多様なウイルスを保有していることが明らかになってきました。病原ウイルスの重要な媒介者として知られるマダニからも、これまで病原ウイルスとして認知されていない多種多様なウイルスが検出されており、ヒトを含むマダニの吸血対象となる動物は、これら多様なウイルスに暴露されている可能性があります。しかし、NGS によって同定されたウイルスの大部分は分離・培養されておらず、それら多くのウイルスの特性は未知のままであるのが現状です。

ヒトやその他の脊椎動物におけるウイルスの感染性や流行状況を評価する直接的かつ効果的な方法は、これらの動物からウイルス遺伝子を検出することです。しかし、脊椎動物の多くはウイルスに暴露されたとしても、多くの場合一過性の感染であり、ウイルス遺伝子は限られた期間しか検出できません。そのため、ウイルス遺伝子検出によって得られる知見は限られています。その一方で、ウイルスの感染によって産生される中和抗体は、ウイルスが動物の体内から排除されたとしても、通常、感染後長期間にわたって体内に存在します。これにより、ウイルスに感染した履歴を調査するためには、中和抗体の検出が非常に有効になります。しかし、この中和抗体を検出するためには、感染性のウイルス粒子が必要です。

本研究は、たとえ分離・培養が困難なウイルスであっても、感染性偽ウイルス粒子による中和試験を用いた疫学調査によって、ウイルスの流行動態の解明が可能であることを実証しました。

今回の研究によって、国内に分布するキチマダニから、新種のフラビウイルスであるサルヤマウイルス（Saruyama virus、以下 SAYAV と省略）を発見しました。SAYAV はキチマダニの他、日本国内で捕獲されたニホンジカやイノシシからもウイルス遺伝子が検出されました。しかし、SAYAV は多くのウイルスに高い感受性を示す培養細胞などでは、分離・培養ができませんでした。

そこで、得られたウイルスの塩基配列をもとにして、SAYAV の外被タンパク質をもつ一回感染性ウイルス粒子（SRIP）を作製し、これを使って血清疫学調査を行いました。日本には日本脳炎ウイルスやダニ媒介脳炎ウイルスなど、SAYAV 以外に 5 種類のフラビウイルスの存在がこれまでに確認されています。本研究ではまず、SAYAV の SRIP がその他のフラビウイルスによって誘導された中和抗体と交差することなく、SAYAV の SRIP を特異的に中和する抗体が検出できることを確認しました。続いて、SAYAV の SRIP を抗原として、山口県から北海道までの日本各地で捕獲されたニホンジカやイノシシの血清に対し中和試験を実施したところ、SAYAV に感染した履歴のあるこれらの動物が本州から北海道までの広い範囲から見つかりました。

今後の展望

今回の調査で、SAYAV はマダニが媒介する脊椎動物感染性のウイルスである可能性は示されましたが、これらの脊椎動物に対して病原性があるかどうかについては不明です。今後、SAYAV の SRIP を用いた本研究と同様のアプローチで、ヒトの血清疫学的な調査を行うことで、ヒトへの感染性や疾患との関係性が明らかになる可能性があります。

また、今回見つかった SAYAV に近縁なウイルスは世界各地に分布している可能性があります。しかし、従来から汎用される方法では分離・培養が困難であることから、これらのウイルスはその流行性が検出されていない可能性が考えられます。本研究で実証された方法は、培養が難しいために病原体として認知されていないウイルスや、未知のウイルスの詳しい生態・疫学調査への応用が期待されます。

研究発表

雑誌名：Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)

タイトル：Identification and epidemiological study of an uncultured flavivirus from ticks using viral metagenomics and pseudoinfectious viral particles

著者：Kobayashi D*, Inoue Y*, Suzuki R*, Matsuda M, Shimoda H, Faizah AN, Kaku Y, Ishijima K, Kuroda Y, Tatemoto K, Virhuez-Mendoza M, Harada M, Nishino A, Inumaru M, Yonemitsu K, Kuwata R, Takano A, Watanabe M, Higa Y, Sawabe K, Maeda K, Isawa H. (*equal contribution)

掲載日：2024 年 4 月 30 日

URL：<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2319400121>

DOI: 10.1073/pnas.2319400121

責任著者：伊澤晴彦

共同研究チーム

国立感染症研究所 昆虫医科学部

小林大介、Astri Nur Faizah、犬丸瑞枝、渡辺護、比嘉由紀子、沢辺京子、伊澤晴彦

国立感染症研究所 獣医科学部

井上雄介、加来義浩、石嶋慧多、黒田雄大、立本完吾、Milagros Virhuez-Mendoza、原田倫子、西野綾乃、前田健

国立感染症研究所 ウイルス第二部

鈴木亮介、松田麻未

山口大学 共同獣医学部

下田宙、高野愛

国立感染症研究所 安全実験管理部

米満研三

岡山理科大学 獣医学部

鋤田龍星

研究支援

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）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「感染症を媒介する節足動物に関する研究」「動物由来感染症の総合対策とネットワーク形成」「新興ダニ媒介性ウイルス重症熱に対する総合的な対策スキームの構築」「節足動物媒介感染症の予防・治療・診断・感染制御に関する研究」、新興・再興感染症研究基盤創生事業「動物・食品・環境・節足動物媒介ウイルス感染症の越境感染に関する研究」、および国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）、厚生労働省厚生労働研究科学補助金、日本学術振興会科研費の支援を受けて行われました。

用語解説

（注 1）感染性偽ウイルス粒子

異種ウイルスに由来する外被タンパク質をまとったウイルス。シュードタイプウイルスともいう。本研究で使用した一回感染性ウイルス粒子[single-round infectious particles (SRIP)]は、感染性偽ウイルス粒子の一種であり、ウイルス粒子内部には外被タンパク質の一部の遺伝子を持たないレプリコン（感染性を欠くが自己複製可能なウイルスゲノム）が存在し、ウイルス粒子表面には異種のフラビウイルスの外被タンパク質（M タンパク質および E タンパク質）が存在する。標的細胞に侵入した SRIP は、レプリコン内部に外被タンパク質の遺伝子を欠くため、子孫ウイルス粒子を細胞外に放出せず、感染が 1 回に制限される。感染性偽ウイルス粒子は、血清疫学調査の他、ウイルスの細胞への侵入機構の解析や、治療薬の研究、さらにはワクチン開発などにも応用されている。

(注 2) 分離・培養

感染している動物からウイルスを単離し人工的にウイルスを増殖させること。ウイルスは自己増殖能を持たず、自身を複製するためには必ず何らかの細胞に感染し、増殖する必要がある。ウイルスの種類によっては、限られた動物や特定の細胞でしか増殖できないものも知られており、分離・培養が困難なものが多数存在している。ウイルスの詳しい特徴を解析するためには分離・培養が必要であり、培養されたウイルスは治療薬やワクチン開発などにも利用される。

(注 3) フラビウイルス

ウイルスの分類学上のグループ名の一つ。最近ではオルソフラビウイルスともいう。フラビウイルスの中には、蚊やマダニといった吸血性節足動物によって媒介されるウイルスが多く含まれており、例えば、蚊によって媒介されるデング熱や黄熱、日本脳炎、またマダニによって媒介されるダニ媒介性脳炎などを引き起こすウイルスがこのグループに分類されている。

(注 4) 中和試験

ウイルスの感染や増殖を阻害する抗体（中和抗体）を検出するために使われる方法。ウイルスに感染した脊椎動物では、通常、この中和抗体が産生される。培養したウイルスあるいは偽ウイルス粒子と希釈した血清を混合する。この混合液を細胞に接種し、どの程度希釈した血清でウイルスの感染や増殖が阻害されたかを観察することによって、中和抗体の量を測定する。ウイルスに対する抗体を調べる試験法の中で、最も特異性が高く感度も良い方法である。

問い合わせ先

<研究に関する問い合わせ>

◆本研究の概要およびマダニからのウイルス検出・ウイルスの性状に関すること

国立感染症研究所 昆虫医科学部

主任研究官 小林大介

電話番号：03-5285-1111（代表）

E メール：dkoba[at]niid.go.jp（[at]は@）

国立感染症研究所 昆虫医科学部

室長 伊澤晴彦

電話番号：03-5285-1111（代表）

E メール：hisawa[at]niid.go.jp（[at]は@）

◆野生動物からのウイルス検出および疫学調査に関すること

国立感染症研究所 獣医科学部

部長 前田健

電話番号：03-5285-1111（代表）

E メール：kmaeda[at]niid.go.jp（[at]は@）

◆一回感染型ウイルス粒子（SRIP）に関すること

国立感染症研究所 ウイルス第二部

室長 鈴木亮介

電話番号：03-5285-1111（代表）

E メール：ryosuke[at]niid.go.jp（[at]は@）

<報道に関する問い合わせ>

国立感染症研究所

総務部調整課研究支援係

電話番号：03-5285-1111（代表）

E メール：info[at]nih.go.jp（[at]は@）