

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305016

研究課題名(和文) ナイジェリア南東部で流行するラッサ熱の分子疫学・病態解析と迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Studies on Lassa fever which is endemic in South-east area of Nigeria

研究代表者

安田 二郎 (YASUDA, Jiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：10282518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラッサウイルスによって引き起こされるラッサ熱は致死性の高い感染症であり、西アフリカ、特にナイジェリアでは深刻な問題となっている。本研究では、他の地域よりも高い致死率が報告されている南東部で2012年から2016年にかけてラッサ熱疑い患者から血清121検体を採集し、解析した。RT-PCR検査の結果、32検体がラッサウイルス陽性であった。ウイルス遺伝子の分子遺伝学的解析からこの地域においてウイルスは抗体等の選択圧力を受けることなく遺伝学的に高度に保存された状態で長期間維持されていることが明らかになった。また、病態の重篤化に腸管出血性大腸菌O157:H7の感染が関わっている可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lassa fever caused by Lassa virus with high virulence is serious problem in West Africa, especially in Nigeria. In this study, we collected 121 serum samples from suspected patients in South-east area of Nigeria during 2012-2016 and analyzed. RT-PCR assay showed that 32 samples were positive for Lassa virus. Genetic analyses for virus genes revealed that Lassa virus has been genetically conserved without any positive selection for long time in this area. In addition, analysis with a next generation sequencer suggested that E. coli O157:H7 may be involved in the increased lethality of Lassa virus infection in this area.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ラッサ熱 ラッサウイルス ナイジェリア 次世代シーケンサー 国際研究者交流

1. 研究開始当初の背景

ラッサ熱は我が国で一類感染症に指定されている極めて致死性の高い感染症であり、重症化例ではしばしば出血熱を主徴とする症状を呈する。ラッサ熱はラッサウイルスの感染により引き起こされるが、このウイルスの自然宿主はヤワゲネズミ(マストミス)というげっ歯類であり、西アフリカで毎年推計30万50万人が感染し、年間5千人以上が死亡している(図1)。ラッサウイルス感染者の約20%が重症化し、重症化患者の致死率は10-20%と言われている。感染者数及び感染域は年々増大しており、先進国への輸入感染も多数報告されている。我が国においても、1987年にラッサ熱の輸入症例が報告されている。現在、国際社会を挙げての対応が迫られているが、ラッサ熱に対するワクチンはなく、ヌクレオシド類縁体であるリバビリンの適応外処方が唯一臨床レベルで効果が認められている治療法である。

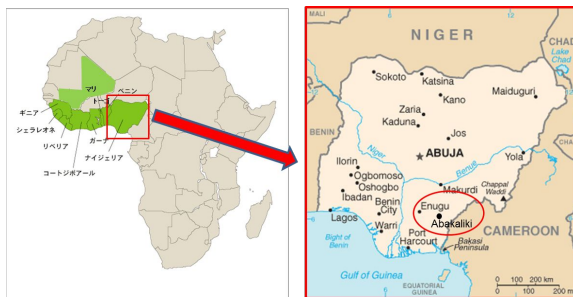


図1. ラッサ熱の分布(左図)とナイジェリア地図(右図)

ラッサ熱が風土病化している西アフリカの国々の中でも特にナイジェリアはラッサウイルスの蔓延が深刻な状況にあり、ラッサ熱はエイズよりも大きな問題になっている。

本調査研究の研究協力者(海外共同研究者)である Dr. Unigwe が感染症ユニット長を務めるナイジェリア大学研修病院(Enugu市)とエボニイ州立大学研修病院(Abakaliki市)があるナイジェリア南東部は国内でもラッサ熱の発生が多い地域の一つである(図1)。この地域では毎年12月4月の乾季に多数のラッサ熱疑い患者が報告されるが、ここ数年は雨季である6月から7月初旬まで患者発生

が続いており、流行が長期化する傾向にある。重症患者の多くはナイジェリア大学研修病院かエボニイ州立大学研修病院に収容されるが、診断は400km以上離れた旧首都のラゴスにある国立医学研究所で蛍光抗体法による血清中のIgGあるいはIgM抗体の検出により行われる。現状では診断結果を得るのに最低でも1週間かかり、しかも確定診断率は20%以下である。この地域におけるラッサ熱発症者(疑い患者含む)の致死率は50%以上と他の地域での致死率(10-20%)と比べて極めて高いが、診断結果を得るのに時間がかかりすぎる点と確定診断率の低さがその要因の一つになっていると思われる。ラッサ熱患者に対しては、発熱等初期症状の発症から6日以内にリバビリン投与を開始すれば効果にばらつきはあるものの致死率を90%-10%減少させることができると報告されているので、現地の病院で行うことができる簡便・迅速なラッサウイルス検出・診断法を開発すれば状況を大きく改善できる可能性が高いと考える。これまで分離されたラッサウイルスは遺伝学的に1から4つの系統に分類されるが、ナイジェリアでは以外の3つの系統のウイルス株がこれまでに分離されている。更に、ラッサウイルスの遺伝子は株間で差異が大きく遺伝的多様性が顕著である為、先ずその地域で蔓延しているウイルス株の遺伝子を詳細に解析し、その分子疫学的解析結果に基づいてウイルス遺伝子検出法の開発を行う必要がある。我々は、これまでにエボラウイルス、マールブルグウイルス、炭疽菌、ポツリヌス菌、更にラッサウイルスについても および 系統のラッサウイルスを簡便かつ迅速に検出する LAMP 法あるいは RT-LAMP 法を開発しているので(Kurosaki et al., 2007, 2009, 2010, Sakuma et al., 2009, Fukuma et al., 2011)、十分な開発能力を有している。

一方で、この地域での高い致死率に他の要

因が関与している可能性も否定できない。例えば、病原性の高いラッサウイルス株が存在する可能性、ラッサウイルス以外の出血熱ウイルスが原因である可能性、他の病原体の重感染が重症化に関与している可能性などであるが、これらを明らかにする為にも上記分子疫学的解析は有効であり、次世代シーケンサーを用いた患者検体に対する病原体の網羅的な探索も必要であると考えた。

2. 研究の目的

ナイジェリア南東部はラッサ熱の発生が非常に多い地域の一つであり、その致死率も他の地域に比べて著しく高い。本研究では、この地域に蔓延するラッサウイルスの分子疫学解析を行い、高価な特殊検査機器がなくても現地で迅速かつ簡便にラッサウイルスの検出・診断が可能なシステムを開発する。早期診断、早期治療を可能にすることで致死率を大幅に改善する。更に、重症化に関与する他の要因についても、(1) ウイルス株と臨床症状の関連性、(2) 他の出血熱ウイルスの存在の可能性、(3) 他の病原体の重感染との関連性(次世代シーケンサーを用いた病原体の網羅的解析)を解析することにより、多角的にその解明を目指す。本研究の成果は、ナイジェリア南東部におけるラッサ熱対策に直接役立つとともに、これまでほとんど解明されていないラッサ熱の病態の解明にも結びつくと期待する。

3. 研究の方法

2011年から2016年にナイジェリア大学研修病院(Enugu市)あるいはエボニイ州立大学研修病院(Abakaliki市)においてラッサ熱疑い患者から血液サンプルを採集した(2011/2012年56検体、2013年10検体、2014年41検体、2015/2016年14検体)。血液サンプルから調製した血清あるいは血漿にTrizolを加え、病原体の不活化およびRNA抽出を行った。抽出RNAに対してラッサウイル

ス表面糖タンパク質GPCのコード領域を標的としたRT-PCRによってラッサウイルス遺伝子の検出を行った。更に、PCR断片の塩基配列も決定した。一部の陽性検体についてはGPCコード領域全体の塩基配列も決定した。

2014年の検体については次世代シーケンサーGSジュニアを用いて網羅的な遺伝子解析を行い、ゲノム全長の塩基配列決定および他の病原体の遺伝子の検出も行った。

2013年の10検体については不活化後、ラッサウイルス、リフトバレー熱ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対するIgMおよびIgG抗体を検出するELISAも行った。ELISA抗原として用いた各ウイルスのNP抗原は国立感染症研究所西條政幸博士、福士秀悦博士よりご分与いただいた。

4. 研究成果

1 ラッサ疑い患者検体に対するPCR検査

RT-PCR検査の結果、2011/2012年は56検体中1検体、2013年は10検体中1検体、2014年は41検体中16検体、2015/2016年は14検体中6検体がラッサウイルス陽性であった。

2 ウイルスの分子遺伝学的解析

陽性検体のうち、7株についてはGPCコード領域全体(1,476塩基)19株についてはPCR増幅領域(GPC:5-321番目、317塩基)の塩基配列を決定した。

GPCコード領域全体の塩基配列を決定した7株(2012-2016年)の相同性を比較した結果、塩基配列の相同性が92%以上、アミノ酸配列の相同性が96%以上であった(表1)。

表1. 2008年分離株と2012-16年分離株のGPCコード領域の相同性比較

	Nucleotide sequence identity (%)							
	Nig 08-04	17(2012)	4(2013)	2(2016)	10(2016)	11(2016)	13(2016)	14(2016)
Nig 08-04		95	98	92	93	94	97	91
17(2012)	98		95	97	93	98	94	98
4(2013)	98	97		95	93	95	97	95
2(2016)	97	99	96		92	97	95	97
10(2016)	99	98	98	97		93	93	93
11(2016)	97	98	97	97	97		94	99
13(2016)	99	98	98	97	98	97		94
14(2016)	97	98	97	98	98	99	97	

Amino acid sequence identity (%)

7株は2008年に同地域で分離された株(Ng08-04)とも非常に相同性が高く、塩基

配列の相同性が91%以上、アミノ酸配列の相同性が97%以上であった(表1)。

更に、7株の塩基配列をもとに最尤法で分子系統樹解析を行った(図1)。その結果、7株はすべて系統に属することがわかった。また、7株は系統内においても同一群に属しており、2008年に同地域で分離された株(Ng08-04)、2012年に近隣地域で分離された株(ISTH2094-NIG/2012)とも同じ群に分類された。

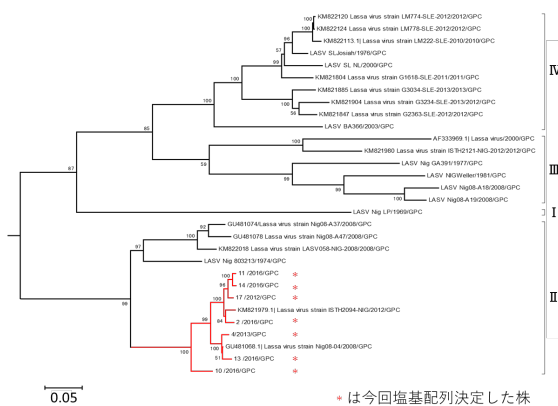


図1. 分子系統樹解析 (GPCコード領域全長、Maximum Likelihood)

GPCのPCR増幅領域の塩基配列を決定した19株についても分子系統樹解析を行った結果、19株すべてが系統に属することが明らかになった(図2)。図1の解析結果同様、すべての株は互いに相同性が高く同一の群に分類され、Ng08-04、ISTH2094-NIG/2012とも同じ群に分類された。

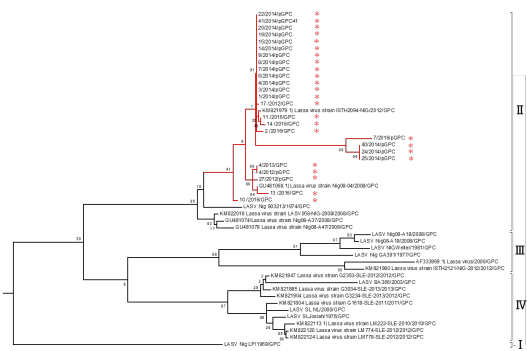


図2. 分子系統樹解析 (GPCPCR増幅領域、Maximum Likelihood)

以上、2および3の結果から、同地域では9年間ほとんど抗体等の選択圧を受けることなく同一系統のウイルスが定着し

ていることが示唆された。

3 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析

2013年の検体の中でラッサウイルス陽性であった1検体について次世代シーケンサー解析で全ゲノム配列の決定を行った。Lセグメント、SセグメントともにNg08-04株と99%の相同性を示した。塩基配列及びアミノ酸配列の違いは、NP領域(1,710塩基)でそれぞれ9か所、0か所、GPC領域(1,476塩基)でそれぞれ17か所、6か所、L領域(6,657塩基)でそれぞれ64か所、11か所、Z領域(300塩基)でそれぞれ2か所、0か所であった。5年経過してもNPおよびZタンパク質のアミノ酸配列が全く同じウイルス株が同定されたことから、この地域でラッサウイルスは自然宿主において変異を伴うことなく高度に保存されていることが示された。

また、2014年の検体でRT-PCR検査でラッサウイルス陽性を示した16検体のうち8検体についても次世代シーケンサー解析を行い、他の病原体の重感染を調べた。その結果、2検体から腸管出血性大腸菌 E. coli O157:H7の遺伝子が検出されたことから、この地域におけるラッサ熱の致死率の高さに腸管出血性大腸菌 E. coli O157:H7の感染が関わっている可能性が示唆された。

4 ラッサウイルス以外の出血熱ウイルスに対する血清検査

2013年の10検体について、ラッサウイルス、リフトバレー熱ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対するIgMおよびIgG抗体を検出するELISA検査を行った。その結果、ラッサウイルスに対する抗体はRT-PCR検査で陽性であった検体においてのみ検出された。また、いずれの検体においてもリフトバレー熱ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する抗体は検出されなかった。

5 技術移転・研修

2013 年度、2014 年度に研究協力者である Dr. Unigwe を長崎大学に招聘し、RT-PCR 法及び RT-LAMP 法を中心としたウイルス遺伝子検出技術の習得を目的とした研修を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Urata, S. and *Yasuda, J.: Cis- and cell type-dependent trans-requirements for Lassa virus-like particle production. *Journal of General Virology*, 査読有、**96** (7), 1626-1635, 2015.

DOI: 10.1099/vir.0.000105.

〔学会発表〕(計 7 件)

安田二朗:「様々な感染症と今後の研究において高度安全実験 (BSL-4) 施設に期待される役割 -BSL-4 施設はいかに長崎、日本、世界を守れるか? -」, 長崎大学第 4 回全力講座、ちとせびあ (長崎県・長崎市) 2014 年 9 月 29 日。招待講演

宮崎 幸子、浦田 秀造、Unigwe Sonny Uche、安田 二朗: ナイジェリアのラッサ熱疑似患者血清に対する次世代シーケンサーを用いた病原体解析、日本ウイルス学会九州支部会、城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市) 2014 年 9 月 5 日

安田二朗:「次々に登場する新しいウイルス感染症」, 第 9 回東京大学医科学研究所ラブラボ、東京大学医科学研究所 (東京都港区) 2014 年 8 月 4 日。招待講演

Yasuda, J.: Development of molecular diagnostics for viral haemorrhagic fevers. 1st Nagasaki University Market Place in London School of Hygiene and Tropical Medicine. London School of Hygiene and Tropical Medicine, London (UK), March 26, 2014.

Yasuda, J.: Emerging Infectious Disease

Research in Connection with Plans for a BSL-4 Facility, 2013 US-Japan Medical Biosecurity and Biodefense Research Symposium, *Bethesda* (MD, USA), Nov 21, 2013. 招待講演

安田二朗:「バイオテロと新興ウイルス感染症」, 京都舞鶴医師会学術講演会、ホテルマーレたかた (京都府舞鶴市) 2013 年 6 月 27 日。招待講演

Yasuda, J.: Diagnostic studies of Lassa fever in Nigeria. 6th US-J Medical Biodefense Research Symposium, “New Frontiers in Medical Biodefense Research Between the United States and Japan”, Nagasaki University (Nagasaki), Feb 4, 2013.

〔図書〕(計 4 件)

安田二朗:「ウイルス性出血熱」, 内科学第 11 版、朝倉書店、2016 年。

安田二朗: 感染症研究とバイオセーフティー、九州実験動物雑誌、No.29、pp49 - 51、九州実験動物研究会、2013 年。

安田二朗: ウイルス性出血熱、化学療法の領域 29 (8) pp33-40、医薬ジャーナル社、大阪、2013 年。

安田二朗: ウイルス性出血熱、今日の治療と看護 (永井良三、大田健編)、pp925-927、南江堂、東京、2013 年。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/emerging/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 二郎 (YASUDA, Jiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：10282518

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

黒崎 陽平 (KUROSAKI, Yohei)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40415443

浦田 秀造 (URATA, Shuzo)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：20614449

(4) 研究協力者

Uche Sonny Unigwe