

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21234

研究課題名(和文)西アフリカにおけるエボラウイルス病疑似症例の感染疫学研究

研究課題名(英文)Viral etiology of suspected ebola virus disease cases in West Africa

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では西アフリカにおけるエボラウイルス病(EVD)の流行時にEVD疑似症例の病因を明らかにするため、ギニア国立ドンカ病院の協力の下、EVD疑似症例(71例)について発熱症状を伴うウイルスおよびマラリアのスクリーニング検出を行った。その結果、デングウイルス、エンテロウイルス、麻疹ウイルス、およびマラリアを検出し、ウイルスの部分的または全ゲノムシーケンスから検出されたウイルスの遺伝子型を同定した。これらの感染症がEVD疑似症例の一因となっており、EVDとの鑑別疾患として重要であること、またこれらの感染症が西アフリカに潜在することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the etiology of non-Ebola virus disease (EVD) cases, which showed EVD-like clinical signs, but were excluded viral infection by a laboratory testing, in the recent endemic of the disease in West Africa. In the collaboration with the National Donka Hospital in Guinea, we conducted screening detection of viruses which causes systematic febrile illness and malaria on the 71 samples from non-EVD cases. We detected dengue virus, enteroviruses, measles virus, and malaria positive cases in these samples, and determined the genotype of the detected viruses using partial or whole genome sequences by Sanger or next generation sequencing. These results suggested that these viruses and malaria caused clinical symptoms similar to EVD, and should be differentiated from EVD in clinical and laboratory diagnosis. Furthermore, these results suggested that these viral diseases have been endemic in Guinea.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス病 西アフリカ 感染疫学 ウイルス シークエンス

1. 研究開始当初の背景

2014-16年、西アフリカにおいてギニア、シエラレオネ、リベリア3か国を中心に過去最大のエボラウイルス病 (Ebola virus disease, EVD) の流行が発生し、世界的な公衆衛生上の危機をもたらした。この流行では、エボラ疑似例のうちPCRによる確定検査でエボラウイルス感染例とされたのは20-30%程度であり、その多くはEVDと類似の初期症状でありながら、実際にはエボラウイルス非感染例である‘エボラ疑似症例’であった。

今回の流行の中心となった西アフリカ3か国は世界でも有数のマラリア好発地域であり、EVD同様出血熱症状を起こすラッサ熱や黄熱、ウェストナイル熱などの報告例もある。よって、マラリアだけでなく、発熱を伴うウイルス感染症がエボラ疑似症例の原因だったと推測される。しかしながら、実際にどのような感染症がエボラ疑似症例の原因になっていたかを示す調査研究はこれまでにほとんどなく、またその病因に関しても理解が進んでいない。エボラ疑似症例の病因を明らかにすることは、EVD流行時の臨床診断および実験室診断において考慮すべき鑑別疾患を提示することが期待でき、感染症対策としても意義が大きい。

西アフリカでは感染症の診断ラボが整備されていないため、この地域で発生するウイルス感染症の発生動向はほとんど把握されていない。エボラ疑似症例はこの地域の感染症の発生状況を反映している可能性があり、その原因を明らかにすることで、西アフリカに潜在するウイルス感染症の発生状況を理解する手掛かりになると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、西アフリカでのEVDの流行において、エボラ疑似症例の原因となったウイルス感染症を明らかにし、更にその成果を通じて、この地域に潜在するウイルス感染症の発生状況を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、ギニアにおけるエボラ診断リファレンスラボを有するギニア国立ドンカ病院 (National Donka Hospital, NDH) の協力を得て実施した。

エボラ流行時の2014年にNDHリファレンスラボにてエボラ疑似とされながら、RT-PCR検査にてエボラ陰性が確定されたエボラ疑似症例の中から、臨床症状として発熱があり、発症日3日内 (急性期) にエボラ診断のため血液検体を採取された症例を抽出した。このうちNDHにおいて、保管状態が良好であった血漿または血清由来抽出RNA71例分を選別し、これを今回の解析に用いた。

各症例由来のRNAを初期サンプルとし、ランダムプライマーを用いて合成したcDNAを鋳型とし、PCR法またはリアルタイムPCR法により検体中に含まれるウイルスのスクリーニング検出を行った。

今回、ギニアおよび西アフリカにて過去に検出例があり、かつ発熱を伴う急性症状を主な初期症状とするRNAウイルスを検出対象とした (表1)。ラッサウイルスやデングウイルスなど個別のウイルスを検出するため、ウイルス種特異的なプライマーを用いた。また、より広いスペクトルのウイルスを検出するため、ウイルス科または属共通に検出するプライマーを用いた。*Plasmodium* 属特異的プライマーを用いてマラリアの検出を併せて行った。PCRでは想定サイズの増幅断片がみられた場合、リアルタイムPCRでは標準RNAを用いて決定したカットオフ値以内のCt値を示した場合を陽性と判定した。

PCRスクリーニングにてウイルス陽性であったサンプルについて、増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンシング法にて決定し、系統解析から各ウイルスの遺伝子型を決定した。またRNA試料から全ゲノム増幅法 (Sequence-independent single primer amplification, SISPA) にて調製したDNAを用い、次世代シーケンサー (Illumina, MiSeq) にてサンプル中に含まれるウイルスのゲノム配列を検出した。

4. 研究成果

始めに、EVD疑似症例の血清由来cDNAを試料に用いたスクリーニングにより、今回解析対象とした71例から、デングウイルス1型 (DV-1) 陽性11/69例 (15.9%)、麻疹ウイルス (MV) 陽性1/69例 (1.4%)、エンテロウイルス (EV) 陽性7/69例 (10.1%) を検出し、更にマラリア陽性11例 (13.9%) を検出した (表1、2)。

表1. エボラ疑似症例のウイルス種特異的プライマーによるスクリーニング検出結果

Targets	The number of sample		
	Tested	Positive	Prevalence
<i>Plasmodium</i> spp.	69	11	15.9%
Dengue virus-1	69	11	15.9%
Dengue virus-2	69	0	
Dengue virus-3	69	0	
Dengue virus-4	69	0	
Yellow fever virus	69	0	
Chikungunya virus	69	0	
Rift Valley fever virus	69	0	
Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	68	0	
Lassa virus	69	0	
Measles virus	69	1	1.4%
Mumps virus	70	0	
Rubella virus	69	0	
Influenza A virus	70	0	

表2. エボラ疑似症例のウイルス属共通プライマーによるスクリーニング検出結果

Targets	The number of cases				Prevalence
	Tested	±	+	Successfully sequenced	
Flavivirus	71	2	2	0	1.4%
Paramyxovirus	69	2	2	1	
Alphavirus	69	0	6	0	
Enterovirus	69	1	10	7	10.1%
Phlebovirus	71	0	0	0	
Hantavirus	71	7	0	0	
Filovirus	71	0	0	0	

次に、PCR 増幅断片より決定したウイルス遺伝子配列をもとに、分子系統解析を行い、各ウイルスの遺伝子型を決定した。今回検出された MV は西アフリカで広く蔓延する B3 型であり、エボラ終息後の 2016 年に流行した MV 株と近縁であった。このことから、麻疹はエボラ流行時また終息後もギニアでは継続的に発生していたことが示唆された。EV についても同様に遺伝子型の同定を行った。今回検出した EV のうちライノウイルスが 6 例（うち A 1 例、B 1 例、C 4 例）であり、エンテロウイルス C が 1 例（ヒトコクサッキーウイルス A13 (CV-A13)）であった。また、NGS による RNA-Seq 解析から、MV および CV-A13 の全ゲノム配列を決定した。更に臨床情報より各症例の居住地域より、ギニアにおける各ウイルスの分布状況を明らかにした（図）。

以上の結果より、西アフリカ地域でも好発するマラリアの他、デング熱、麻疹、エンテロウイルス感染症などがエボラ疑似症例の原因の一端となっていたことが明らかになった。EVD 流行時にはマラリアやこれらのウイルス感染症例が EVD 疑い例としてエボラ治療施設に収容されたことを示す。EVD 対策として、他の発熱疾患と EVD との鑑別診断の必要性が改めて示された。今回 DV-1 については、シーケンス解析のための PCR 増幅が成功せず系統解析を実施できなかった。いずれのリアルタイム PCR 陽性例も Ct 値が高く、初期 RNA 試料中のウイルス RNA コピー数が少なかったためと考えられる。

今回ギニアではこれらのウイルス感染症が潜在することが示唆された。ギニアにおいてエンテロウイルスやデングウイルスの分離例はこれまでになかった。詳細な情報を得るため引き続きサーベイランスが必要だと考えられる。麻疹は、断続的にアフリカで流行していることから、今回 LAMP 法による MV の遺伝子検出法の確立を試みた。既に報告されているプライマーセットと携帯型 LAMP 検出・増幅装置 GenieIII (Optigene) により、今回同定されたギニア株の検出を試みたが、十分な検出感度が得られなかった。今後、鑑

別診断法の開発が課題として残ったため、引き続き実施する予定である。

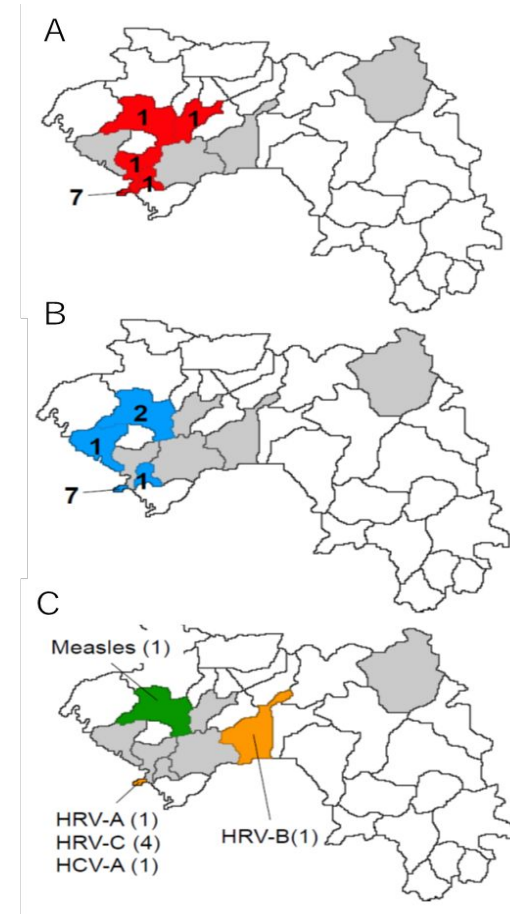


図. ギニアにおけるマラリア(A)、デングウイルス1型(B)、麻疹およびエンテロウイルス感染症(C)の発生分布。数字は本研究での検出例数を表す。

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)

1. Kurosaki Y, Ueda MT, Nakano Y, Yasuda J, Koyanagi Y, Sato K, Nakagawa S. Different effects of two mutations on the infectivity of Ebola virus glycoprotein in nine mammalian species. J Gen Virol. 2018 Jan 4. 査読有

[学会発表](計 3件)

1. Kurosaki Y, Ueda MT, Izumi T, Nakano Y, Oloniniyi O, Yasuda J, Koyanagi Y, Sato K, Nakagawa S. Functional mutations in spike glycoprotein of ebolaviruses associated with alterations in infection efficiency. 9th International Filovirus Symposium

2017. Marburg, Germany, September 13-16, 2017.

2. 黒崎陽平, 上田真保子, 中野雄介, 安田二郎, 小柳義夫, 佐藤佳, 中川草. エボラウイルス西アフリカ流行株に見られたアミノ酸変異とその機能的影響. 第70回日本細菌学会九州支部総会・第54回日本ウイルス学会九州支部総会. 沖縄県那覇市、2017年9月8-9日.
3. Kurosaki Y, Magassouba N, Oloniniyi O, Yasuda J. Deployment of rapid and portable diagnostic test for field surveillance of Ebola virus disease in Guinea. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2016 · Vienna, Austria · November 4-7, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

N' Faly Magassouba ギニア国家出血熱対策プロジェクト・ウイルス診断部長