

令和元年6月13日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15830

研究課題名(和文) アフリカにおけるウイルス性感染症の迅速検出法開発と大規模疫学的解析

研究課題名(英文) Development of detection method of viruses and epidemiological analysis

研究代表者

阿部 遥 (ABE, Haruka)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：90554353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アフリカにおいて感染拡大が懸念されている蚊媒介性感染症について、解析機器の整備が不十分な現地施設でも使用できる検出技術を開発した。核酸の等温増幅法を応用し、ウイルスに特異的なオリゴDNAを設計して感度・特異性の高い検出法を開発した。開発した検出法および既知の検出法を組み合わせ、現地患者検体を解析した結果、ガボンではほとんど報告のない血清型のデングウイルスを検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による成果は、ガボンにおいてデングウイルス感染リスクが存在することを示すとともに、現地医療機関・研究機関にデング熱が流行していることを認識させるための重要な報告である。この結果は現地研究機関にすでに報告されており、現地研究機関からガボン全土へ情報が広まることで、デング熱に対する適切な診断・処置が促進されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a sensitive detection system for arboviruses was developed to use in a poorly equipped local settings. Based on the isothermal amplification method of nucleotides, oligo DNAs specific to each virus were designed. Our method showed high sensitivity and specificity. Clinical samples of febrile patients of the study area were analyzed by our method and another known method, resulting in the detection of the dengue virus whose serotype has been rare in Gabon.

研究分野：疫学

キーワード：ウイルス アフリカ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ジカ熱やデング熱の感染拡大や、中部アフリカで発生した黄熱病の流行など、蚊媒介性ウイルス感染症が世界各地で問題となっている。このようなウイルス感染症の実態を把握し感染拡大を防止することは公衆衛生の観点から喫緊の課題となっているが、特にアフリカ諸国では迅速診断技術の導入が遅れており、感染状況を即座に把握し対策を講じることが大変難しいのが現状である。

ガボン共和国は中部アフリカ沿岸に位置する赤道直下の国で、感染症が死亡原因の大きな割合を占めている。これまでガボン共和国ではデング熱・チクングニア熱の周期的な流行が報告されており、黄熱病の発生も報告されている。しかしながら、ガボン共和国を含む中部アフリカではジカ熱・デング熱を始めとする蚊媒介性ウイルス感染症に対する適切な迅速検出法は未だに導入されていないため詳細な感染実態は把握されていない。以上から、ガボン共和国では蚊媒介性ウイルス感染症の迅速検出技術の開発により感染症罹患の現状を把握すること、そして感染症の疫学的な解析結果から感染拡大防止策を講じることが強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、アフリカのガボン共和国における熱性疾患患者検体を用いて、蚊媒介性ウイルス感染症の検出技術を開発するとともに、大規模ヒト検体の解析結果に基づく疫学的解析から、ウイルスの由来、地域性、罹患率等の疫学的情報を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

等温迅速検出法 (RPA 法、LAMP 法など) は優れた等温迅速検出ツールであり、特殊な機器を必要としないことから臨床現場における迅速検出法への応用が可能である。ガボン共和国で現在流行しているウイルス感染症を調査するために、ウイルスゲノム RNA を逆転写後に迅速に検出する方法を、等温迅速検出法を応用して開発する。対象とするウイルスは、現在アフリカで感染拡大が懸念されている蚊媒介性ウイルスとする。

微量のウイルスゲノムを効率的に逆転写する酵素を選択し、ウイルスゲノムを効率よく増幅するプライマーを複数セットずつ設計する。プライマー設計後は、各ウイルスゲノムリファレンス RNA を用いて 1 反応あたり数十コピーのウイルスゲノムを検出できる高感度の検出法であることを確認する。その後、現地臨床検体を用いて、感度および特異性の試験を行う。

## 4. 研究成果

本研究では、アフリカにおいて感染拡大が懸念されている蚊媒介性感染症(デングウイルス、チクングニアウイルス等)について、解析機器の整備が不十分な現地施設でも使用できる検出技術を開発した。研究代表者は核酸の等温増幅法を応用し、各ウイルスに特異的なオリゴ DNA を設計して感度・特異性の高い検出法を開発した。ウイルス検出用プライマーは各ウイルスの保存領域に設計し、ウイルスゲノムの多様性に関わらず安定してウイルスが検出できるようにした。特に 5' 非翻訳領域、または 3' 非翻訳領域は保存性が高く、プライマー設計の条件を満たしていたため、デングウイルスでは 5' 非翻訳領域を、チクングニアウイルスでは 3' 非翻訳領域を用いた。

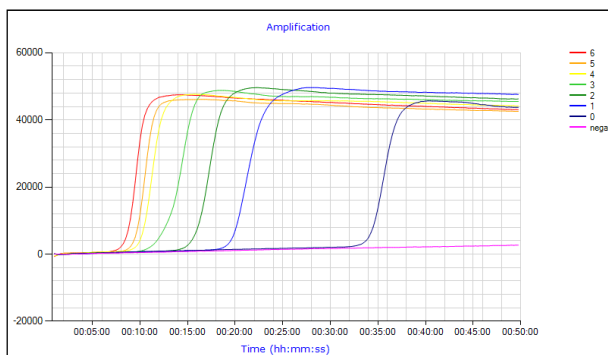


図1 デングウイルス血清型1のRNA検出

設計したプライマーと合成した標的 RNA 断片を用いて検出感度試験を行った結果、数十コピーの RNA を検出できる優れた検出力を示すことが分かり (図 1、図 2) またウイルス間で交差反応を示すこともなかった。このため、設計したプライマーは感度、特異性ともに十分であると判断した。また、デングウイルス各血清型のプライマーをすべて混合すると、デングウイルスを血清型によらず高感度で検出できることも確認した (図 3)。

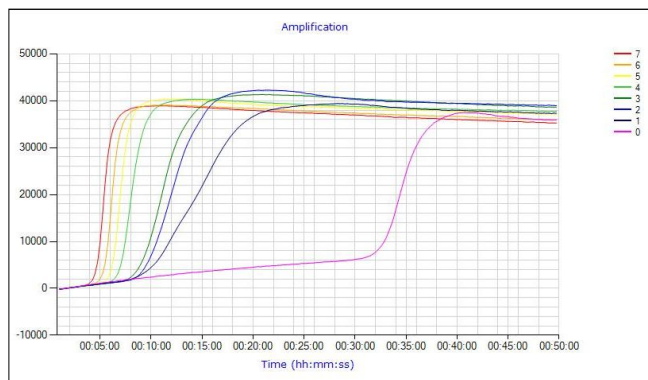


図 2 チクングニアウイルス RNA の検出

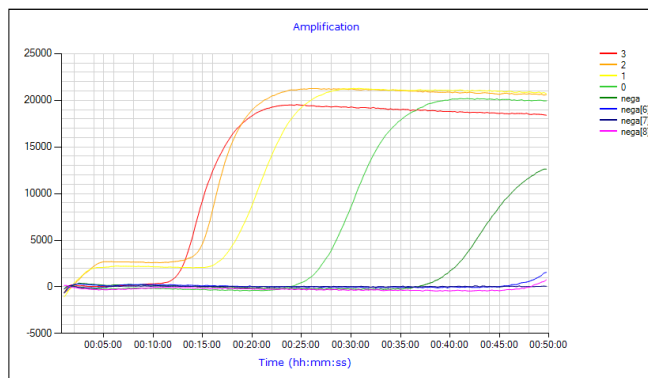


図 3 デングウイルス混合プライマーによるウイルス RNA の検出

開発した検出法および既知の検出法を組み合わせることで現地患者検体を解析した結果、ガボンではほとんど報告のない血清型 3 のデングウイルスを検出した (図 4) 。さらに、デングウイルス陽性および陰性患者の年齢・性別情報を解析したところ、成人検体からのデングウイルス検出が全体の 9 割を超えていることを明らかにした。

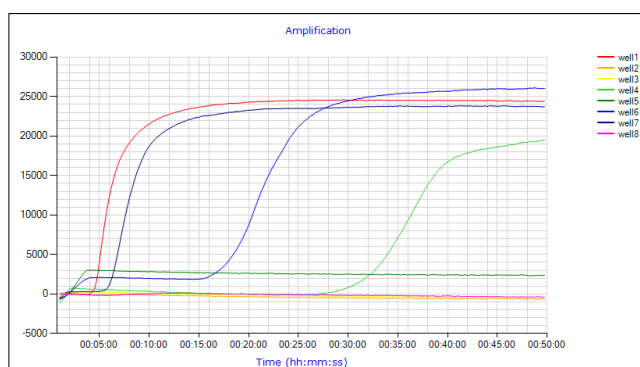


図 4 臨床検体を用いたデングウイルスの検出

ガボンでは、2007 年および 2010 年のデングウイルスアウトブレイクが報告されており、主にデングウイルス血清型 2 が検出されていた (Caron M., PLoS One, 2013) 。また、デングウイルスアウトブレイク時にはチクングニアウイルスも同時に流行していることが報告されていた (Caron M., Clin Infect Dis, 2012) 。本研究の結果では、デングウイルス血清型 2 およびチクングニアウイルスは検出されず、ガボンではほとんど報告のないデングウイルス血清型 3 が検出された。この結果から、2010 年から現在までの数年間でガボン国内を循環している主要な

デングウイルスの血清型が変わってきている可能性があることが示唆された。

アフリカにおけるデングウイルス血清型3の報告は、欧州からのアフリカ大陸旅行者の帰国後の発症に基づくものがほとんどである (Shihada S., Emerg Infect Dis, 2017)。本研究で開発した検出法は、アフリカの現地でデングウイルスを含む蚊媒介性ウイルス感染症を高感度で検出することを可能としている点で意義深いものである。

デングウイルス感染後に獲得する抗体の力価によっては、次のデングウイルス感染時の症状が重篤化する可能性が示唆されており、デングウイルスに複数回感染することへのリスクを現地で共有することが重要である。ガボンでは2007年および2010年にデングウイルスアウトブレイクが報告されており、また現在もデングウイルスが一定数の患者で検出されていることから、デングウイルスに複数回感染するリスクが高いと考えられる。本研究で開発した検出法は、蚊媒介性ウイルス感染症の迅速かつ正確な診断に貢献することが期待され、現地におけるウイルス感染症の流行状況をモニタリングするうえでも有用である。

これらの結果は、ガボンにおいてデングウイルス感染リスクが存在することを示すとともに、現地医療機関・研究機関にデング熱が流行していることを認識させるための重要な報告である。この結果は現地研究機関にすでに報告されており、現地研究機関からガボン全土へ情報が広まることで、デング熱に対する適切な診断・処置が促進されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第66回日本ウイルス学会学術集会

Continuous Circulation of Dengue Virus Serotype-3 in Gabon

Haruka Abe, Yuri Ushijima, Marguerite M. Loembe, Selidgi T. Agnandji, Bertrand Lell, Jiro Yasuda

口頭発表

平成30年10月30日、京都テルサ

Les promesses de la biomedecine vues d'Afrique

Investigation of viral diseases in Gabon

Haruka Abe, Yuri Ushijima, Jiro Yasuda

口頭発表

平成29年7月20日、ランバレネ医療研究センター(ガボン)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。