

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18777

研究課題名(和文) レストンエボラウイルスはアジアのウイルスか？ - 南部アフリカにおける疫学調査

研究課題名(英文) Is Reston ebolavirus an Asian virus? - Epidemiological investigation in Southern Africa

研究代表者

小川 寛人(Ogawa, Hirohito)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80455237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスは重篤な出血熱を起こす。その中の1種であるレストンエボラウイルスはアジアでのみ認められている。これまでにザンビア共和国で行った果食コウモリの調査では、アフリカにもレストンエボラウイルスが導入されている可能性が示唆された。本研究では、ザンビア共和国でレストンエボラウイルスの自然宿主の一つと考えられているブタでの疫学調査を行い、本ウイルスがアジアのみならずアフリカにも分布するか調査した。ブタ血清1082検体をELISA法でスクリーニングした結果、10検体で陽性が疑われた。レストンエボラウイルスがザンビアのブタにすでに導入されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ebolavirus causes severe hemorrhagic fever. Reston ebolavirus which is one of ebolavirus species has thus far been found only in Asia. Our previous serological surveillance of filoviruses in fruit bats migrating to Zambia suggested that Reston ebolavirus or Reston-like virus existed in Africa. In this study, we carried out a serological survey to detect Reston ebolavirus-specific IgG antibodies in pig, which is suspected to be one of natural hosts, in Zambia. A total of 1082 swine serum samples were screened for IgG antibodies specific to the Reston ebolavirus by ELISA method, and the OD values obtained were analyzed statistically. Ten samples were found to be IgG positive, suggesting that Reston ebolavirus or Reston-like virus have been introduced into the pig population in Zambia.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス レストンエボラウイルス フィロウイルス ブタ ザンビア共和国 アフリカ 人獣
共通感染症 血清疫学

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスはヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こすウイルスとして知られており、系統学的には5種(ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、タイフォレストエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルスおよびレストンエボラウイルス)に分類される。2013-2016年に西アフリカで多くの患者・死者を出したザイールエボラウイルス、そしてスーダンエボラウイルス、タイフォレストエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルスの4種は、アフリカで発生した致死性出血熱患者から分離された。一方、レストンエボラウイルスは唯一アジア(フィリピン)を発生起源とし、ヒトを除く霊長類で致死性出血熱が認められている。コウモリがエボラウイルスの自然宿主として有力視されているが、未だ同定されていない。レストンエボラウイルスに関しては、フィリピンで発生した高病原性ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)に罹患した家畜ブタから分離されており(Barrette et al, *Science*, 325:204-206, 2009)、ブタが自然宿主と考えられているが、こちらも未だ明らかとなっていない。ウイルスの自然界での動態や自然宿主を知ることが、感染拡大を防ぐ上で重要な課題となっている。

研究代表者らは、エボラウイルスの自然宿主探索のため、南部アフリカに位置するザンビア共和国(以下、ザンビア)で果食コウモリ(*Eidolon helvum*)の疫学調査に取り組み、これまでにフィロウイルスの生態に関して報告している(Ogawa et al, *J Infect Dis*, 212:S101-108, 2015)。その中で血清学的にレストンエボラウイルスがアフリカの *E. helvum* に感染している事を発見した。このことは、アジアのウイルスと考えられている本ウイルスがアフリカでも認められる事を示唆するものであった。

2. 研究の目的

本研究では、ザンビアにおいてレストンエボラウイルスの自然宿主とも考えられているブタで疫学調査を行い、本ウイルスがアジアのみならずアフリカにも分布するのか明らかにすることを目的とした。また、PRRSVや免疫低下に関連するブタサーコウイルス2型(PCV2)を分子疫学的に検索し、レストンエボラウイルスの感染・病態発現に関与するか検証する。

3. 研究の方法

(1) レストンエボラウイルスの血清疫学的解析

これまでにザンビアで採材・保管されているブタ血清の入手、また新たに屠畜場等での採材を行い、レストンエボラウイルス組換え表面糖蛋白質(GP)を抗原とした Reston GP-based ELISA(Nakayama et al, *J Infect Dis*, 204:S978-985, 2011)でGPに対する反応性を

スクリーニングした。ELISAで得られた全血清の光学密度(OD値)をスミルノフ・グラブス検定にて統計学的解析を行い、有意に高い値(外れ値)を示した検体を陽性と判定した。その後、ウェスタンブロッティング法により陽性血清のGPとの反応性を定性的に確認した。

(2) ウイルスの分子疫学的解析

血清を採材エリアや採材年から5検体ずつプールし、核酸(RNA/DNA)を抽出した。

① レストンエボラウイルス遺伝子検出

研究代表者らが開発したフィロウイルスのヌクレオ蛋白質(NP)遺伝子を検出する RT-PCR法(Ogawa et al, *J Virol Methods*, 171:310-313, 2011)を初回ラウンドに使用し、この初回ラウンドのPCR産物をさらにレストンエボラウイルス NP 特異的プライマー(Jayme et al, *Virol J*, 12:107, 2015)を用いてPCR法で増幅を試みた。

② PRRSV 遺伝子検出

研究代表者らが設計した PRRSV 遺伝子を検出する特異的プライマーを用いた RT-PCR法(Ogawa et al, *J Virol Methods*, 160:210-214, 2009)でウイルス遺伝子の増幅を試みた。

③ PCV2 遺伝子検出

研究代表者らが設計した PCV2 遺伝子を検出する特異的プライマーを用いた PCR法(Ogawa et al, *J Virol Methods*, 160:210-214, 2009)でウイルス遺伝子の増幅を試みた。

4. 研究成果

(1) レストンエボラウイルスの血清疫学的解析

研究期間内に2011年から2016年にザンビア国内10地域で採材されたブタ血清1082検体を入手した(図1および表1)。これら全ての血清を Reston GP-based ELISA でスクリーニングし統計学的解析を行った結果、10検体でOD値が有意に高かった。これらの検体は抗レストンエボラウイルス IgG 抗体陽性と考えられ、レストンエボラウイルスの感染が示唆された($p < 0.05$, 外れ値の最小値=1.2176)(図2および表2)。

次にレストンエボラウイルスのGP、NP、マトリックス蛋白質(VP40)発現プラスミドを293T細胞に共発現して作出したウイルス様粒子を抗原として、陽性10検体をウェスタンブロッティング法で解析した。しかしながら、GP特異的バンドは検出されなかった。

ELISAスクリーニングでは、統計学的に陽性が疑われる検体の他にも高いOD値を示す個体が存在することから、レストンエボラウイルスまたはレストンエボラウイルス様ウイルスがザンビアのブタに広く導入されている可能性が高いと考えられた。詳細な結果を得るためには、ウェスタンブロッティングの試験結果が必要不可欠であるため、再度条件検討を行った後、再試験の必要があると考える。

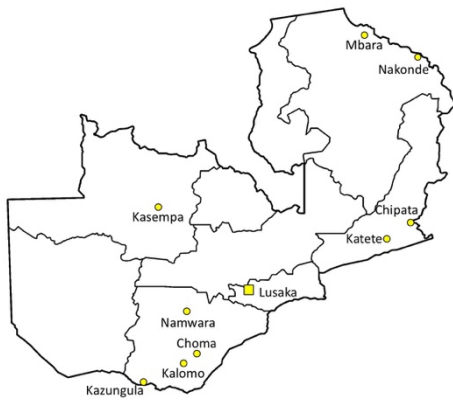


図 1. 採材エリア

表 1. 検体の詳細

Sampling area	District	Province	Year	No.	Total
Namwara	Namwara	Southern	2014	100	100
Choma1	Choma	Southern	2014	196	252
Choma2			2015	56	
Kazungula	Kazungula	Southern	2014	24	24
Kalomo	Kalomo	Southern	2014	18	18
Mbala	Mbala	Southern	2014	30	30
Nakonde	Nakonde	Muchinga	2014	42	42
Kasempa	Kasempa	North-Western	2014	20	20
Chipata	Chipata	Eastern	2014	20	20
Katete	Katete	Eastern	2015	308	308
Lusaka1	Lusaka	Lusaka	2011	100	268
Lusaka2			2012	40	
Lusaka3			2015	47	
Lusaka4			2016	81	
Total				1082	

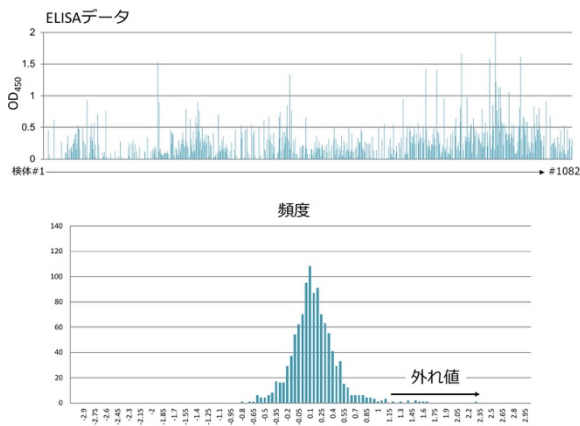


図 2. 全検体の ELISA データ (上段) および統計学的解析により抽出された外れ値 (下段)

表 2. 陽性 10 検体の詳細

Sample No.	Sampling area	Province	Year	OD ₄₅₀	P-value
619	Katete	Eastern	2015	2.3484	P<0.01
571	Katete	Eastern	2015	1.6578	P<0.01
655	Katete	Eastern	2015	1.6166	P<0.01
611	Katete	Eastern	2015	1.5814	P<0.01
150	Mbala	Southern	2014	1.5304	P<0.01
915	Choma1	Southern	2014	1.5297	P<0.01
520	Katete	Eastern	2015	1.4277	P<0.01
536	Katete	Eastern	2015	1.401	P<0.01
326	Lusaka4	Lusaka	2016	1.3322	P<0.01
620	Katete	Eastern	2015	1.2176	P<0.05

(2) ウイルスの分子疫学的解析

ブタ血清を 5 検体ずつプール (一部 2~6 検体/プール) して作製した計 213 プール血清から核酸 (RNA/DNA) を抽出した. これらの検体を用いてウイルス遺伝子検出を試みたが, レストンエボラウイルスおよび PRRSV 遺伝子は検出されなかった. 一方, PCV2 遺伝子は 114 プール血清 (53.5%) から検出された. 採材エリア毎の ELISA スクリーニング結果と PCV2 陽性率をプロットして差異を検討したが, 相関関係は明らかにはならなかった (図 3).

PCV2 感染はブタに免疫低下を引き起こし多くの病態発現に起因する事から, レストンエボラウイルス感染への影響が考えられたが, 今回の結果からは明らかとならなかった. PCV2 感染が関係しない事も考えられるが, 核酸抽出時に血清をプールした影響もあるため, 今後は検体毎に核酸抽出を行う必要がある. また, 本研究開始直前の 2013~2015 年はザンビアの広域でアフリカ豚コレラ (ASF) の発生が認められた (Yabe et al, *Trop Anim Health Prod*, 47:459-463, 2015; Simulundu et al, *Transbound Emerg Dis*, 65:114-122, 2018). ASF は, 高病原性 PRRSV 感染症と類似した皮下出血や脾腫等を呈し, 高い致死率を伴う疾病である. 本研究で使用した血清には, ASF 発生時の検体や同一農場, エリアの血清が含まれている. ELISA スクリーニングで高い OD 値を示した検体の中にはこれらの検体も多く含まれるため, 今後アフリカのブタでレストンエボラウイルスの疫学調査を行う際には, アフリカ豚コレラウイルスとの共感染や, 採材エリアやその周辺地域での ASF 発生状況を同時に調査する事も興味深い. これにより病態発生に関して新たな知見が得られるかもしれない.

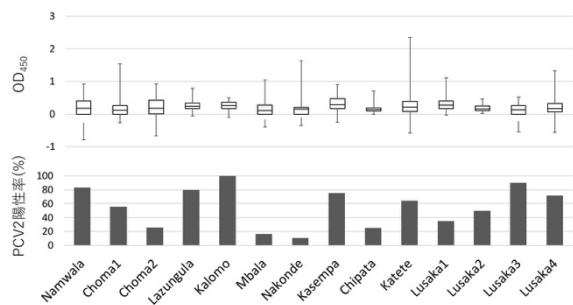


図 3. 採材エリア毎の ELISA OD 値 (上段) と PCV2 陽性率 (下段) の比較

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 2 件)

- ① Simulundu E, Chambaro HM, Sinkala Y, Kajihara M, Ogawa H, Mori A, Ndebe J, Dautu G, Mataa L, Lubaba CH, Simuntala C, Fandamu P, Simuunza M, Pandey GS, Samui KL, Misinzo G, Takada A, Mweene

AS. Co-circulation of multiple genotypes of African swine fever viruses among domestic pigs in Zambia (2013-2015). *Transbound. Emerg. Dis.*, 査読有, 65(1), 2018, 114-122.

DOI: 10.1111/tbed.12635

- ② Ogawa H, Kajihara M, Nao N, Shigeno A, Fujikura D, Hang'ombe BM, Mweene AS, Mutemwa A, Squarre D, Yamada M, Higashi H, Sawa H, Takada A. Characterization of a Novel Bat Adenovirus Isolated from Straw-Colored Fruit Bat (*Eidolon helvum*). *Viruses.*, 査読有, 9(12), 2017, E371. DOI: 10.3390/v9120371

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小川寛人. フィロウイルスの自然宿主は？-ザンビアでオオコウモリを追う-. 第 233 回アフリカ地域研究会、2018 年 2 月 15 日、京都大学稲盛財団記念館 (京都府京都市)
- ② 小川寛人、梶原将大、直亨則、丸山隼輝、上野恵介、石井秋宏、藤倉大輔、Hang'ombe Bernard、Aaron Mweene、山田雅夫、東秀明、澤洋文、高田礼人. ザンビア共和国に飛来するストローオオコウモリ (*Eidolon helvum*) から分離されたアデノウイルスの性状解析と分子疫学的解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日～8 日、日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市)
- ③ Kajihara M, Ogawa H, Miyamoto H, Changula K, Qiu Y, Mori A, Yoshida R, Thomas Y, Nakagawa E, Hang'ombe B, Simulundu E, Muleya W, Katampi J, Igarashi M, Moonga L, Ndebe J, Kapila P, Mweene A, Takada A. Seroepidemiological prevalence of multiple species of filoviruses in fruit bats (*Eidolon helvum*) in Zambia. 8th International Symposium on Filoviruses. 12-15 September 2016, Antwerp, (Belgium)
- ④ 小川寛人、宮本洋子、中山絵里、吉田玲子、中村一郎、澤洋文、石井秋宏、トーマス由佳、中川恵美子、松野啓太、梶原将大、丸山隼輝、直亨則、村松美笑子、黒田誠、Edgar Simulundu、Katendi Changula、Bernard Hang'ombe、Boniface Namangala、Andrew Nambota、Jackson Katampi、五十嵐学、伊藤公人、Heinz Feldmann、杉本千尋、Ladslav Moonga、Aaron Mweene、高田礼人. アフリカに生息するストローオオコウモリ (*Eidolon helvum*) におけるフィロウイルスの血清疫学調査. 第 30 回中国四国ウイルス研究会、2015 年 6 月 27 日～28 日、くらしき山陽ハイツ (岡山県倉敷市)

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

該当なし

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 寛人 (OGAWA, Hirohito)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 80455237

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし