

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16673

研究課題名(和文) 中部アフリカにおける出血熱ウイルス不顕性感染の網羅的解析及び抗体遺伝子配列解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of subclinical hemorrhagic fever virus infections and sequence analysis of variable region gene of human antibody in Central Africa

研究代表者

牛島 由理 (USHIJIMA, Yuri)

長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員

研究者番号：80812297

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)：本研究は、ガボン共和国において抗出血熱ウイルス抗体陽性検体を同定し、その抗体の遺伝子配列を決定することを目的とした。研究期間内に、ザイール・スーダン・ブンディブギョエボラ、マルブルグ、クリミア・コンゴ出血熱、ラッサ、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に対する抗体陽性検体を同定した。その後、抗体配列を決定する予定であったが、新型コロナウイルスの影響により研究の中断を余儀なくされた。代わりに、アフリカ初の抗LCMV中和抗体検出という結果から、LCMVの感染リスクを明らかにするための解析を進め、身近な齧歯類および野生動物ヤマアラシとの接触がLCMV感染のリスク因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ウイルス感染防御メカニズムの解明や有効なワクチンや治療薬の開発へと発展する研究の礎を築くものである。また、ウイルス感染症研究が盛んでないガボン共和国において、新たな知見を見出す可能性が高かった。実際、新型コロナウイルスによる研究中断により抗体配列の決定まで到達することは出来なかったが、ガボン共和国で過去報告のなかった出血熱ウイルスに対しても抗体陽性者を見出し、現在考えられているウイルス感染症の感染域に一石を投じた。また、ヒト住環境周辺地域に存在する野生動物がLCMV感染のリスク因子であることも明らかにし、感染防御対策を講じる上で重要な情報を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify anti-hemorrhagic fever virus antibody positive specimens and to determine sequences of variable region gene of the human antibodies in Gabon, Central Africa. In the study period, I found antibody-positive samples against a total of 7 viruses including Zaire, Sudan, Bundibugyo ebolavirus species, Marburg virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Lassa virus, and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). Subsequently, I planned to sequence variable region gene of the antibodies of these samples; however, I was forced to abandon the study plan due to COVID-19 pandemic. Instead, I proceeded with an analysis to clarify risk(s) of an infection with LCMV, against which antibodies with neutralizing activity were detected in humans in Africa for the first time. In the result, I found that contact with familiar rodents and wild porcupines was a risk factor for LCMV infection in the country.

研究分野：ウイルス学、細菌学

キーワード：新興・再興感染症 ウイルス サーベイランス 公衆衛生 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界では感染症が死因の上位を占めている。感染症対策として、様々なワクチンや抗ウイルス薬、またそれら候補が存在するが、投与時期や年齢の限定、副作用の問題が残されているものもある。そのため、より安全で効果的かつ有効なワクチンや治療薬の開発が切望されている。

ヒトモノクローナル抗体は、本来体内に存在するため副作用が少なく、また抗原の特定部位を狙い撃ちできることから効果的で有効な抗体医薬として期待されている。一方で、感染性を増強する抗体があることも知られている。抗体の構造や機能を解明することはワクチンや治療薬の開発に重要であることが分かる。

アフリカ中部に位置するガボン共和国は、熱帯地域特有の感染症が数多く存在し、これまでに4回のエボラ出血熱のアウトブレイクが起きている。従って、ガボン共和国にはエボラウイルスに対する抗体を保有する感染後の回復者や不顕性感染者がある一定数存在すると考えられる。しかし、その具体的な抗体保有率や、抗体の構造や機能に関する情報はほとんどない。

これまで、ガボン共和国で懸念されるウイルス感染症を対象にヒトの抗体保有率予備調査を行ってきた結果、エボラウイルスやこれまでガボン共和国で発症報告のないラッサウイルスなどを含む高病原性ウイルスに対して陽性を示す検体が見つかった。このことから、ガボン共和国にはそれらウイルスに対する感染者が存在することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、過去にエボラ出血熱のアウトブレイクを経験し、ある一定数の抗エボラウイルス抗体保有者が存在するガボン共和国において、抗出血熱ウイルス抗体陽性検体を同定し、その抗体の遺伝子配列を決定することを目的とした。エボラウイルスに加え、ガボン共和国で感染リスクがあり、先行する抗体保有率調査で ELISA 陽性検体が見つかったラッサウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスも対象に含めた。また、ガボン共和国ではヒト住環境周辺地域に齧歯類などの野生動物が存在するため、齧歯類が媒介するラッサウイルスに近縁のリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) も、出血熱ウイルスではないが本研究の対象ウイルスに含めた。本研究により、ガボン共和国に存在する抗出血熱ウイルス抗体の遺伝子配列情報を明らかにし、今後のワクチン開発研究や抗体薬創薬研究に繋がる重要な情報を明らかにしようとするものであった。

しかしながら、本研究折り返し直前の令和1年度3月、現地での活動中に新型コロナウイルスパンデミックの影響を受け緊急帰国となったため、本研究計画を進めることが非常に困難となり中断を余儀なくされた。代わりに、令和1年度で見出したアフリカ初の LCMV に対するヒト中和抗体検出という結果から、LCMV 感染のリスク因子を明らかにするための解析を進めた。これらは、既に日本で保管していた熱性疾患患者血清およびその検体から抽出した RNA を用いて実験を進めることができた。

3. 研究の方法

(1) 抗出血熱ウイルス抗体陽性検体の同定

協力機関であるランバレネ医療研究センターで採取されたヒト血清検体を用いて標的ウイルス7種類に対する抗体スクリーニングを行った。抗体検出には、各ウイルスの表面糖タンパク質をヒト細胞内で発現するプラスミドを作製し、細胞溶解上清液あるいは精製タンパク質を抗原として IgG 抗体検出間接 ELISA 法を用いて行った。ELISA 陽性検体は特異性を確かめるため、表面糖タンパク質を被ったシュードウイルスを用いた中和試験による検証を順次行った。

当初の計画では、その後、高い中和抗体価を示したヒト検体から末梢血単核細胞を分離し B 細胞画分を回収し、抗原結合能のある B 細胞を分離後、抗体遺伝子配列を同定する予定であった。

(2) アフリカ大陸初の感染履歴を見出した LCMV 感染のリスク因子の解明

(1)に記載の研究計画の中止に代わって、令和1年度で見出したアフリカ大陸初の LCMV に対するヒト中和抗体検出という結果(下記図)から、LCMV 感染のリスク因子を明らかにするための解析を進めた。既に日本で保管していた熱性疾患患者血清から抽出した RNA を用いて遺伝子の検出を行った。また、別課題で採取していた齧歯類を始め、食虫目、野生動物の食肉(ブッシュミート)について、血清と腎臓から抽出した RNA を用いて、抗体と遺伝子の検出をそれぞれ調べた。PCR 陽性 RNA に対しては、LCMV の一部分あるいは全長配列を同定するため、サンガーあるいは次世代シーケンシングを行った。

4. 研究成果

(1) 抗出血熱ウイルス抗体陽性検体の同定

ELISA および中和試験による抗体調査の結果、すべてのウイルスに対して抗体陽性検体を見つけた（表1）。しかし、その後計画していた抗体遺伝子配列の決定は、新型コロナウイルスによる現地活動の制限により末梢血単核細胞を準備することが出来ず、また現地からの約1年間の緊急退避のため、本研究を継続することが出来なくなり達成することが出来なかった。

表1. 各ウイルス抗原に対するヒト検体陽性反応（IgG抗体検出間接ELISA法）

ウイルス名	ザイール エボラ ウイルス	スーダン エボラ ウイルス	ブンディブ ギョエボラ ウイルス	マールブルグ ウイルス	クリミアコン ゴ出血熱ウイ ルス	ラッサ ウイルス	リンパ球性脈 絡髄膜炎ウイ ルス
陽性検体数	28/365	157/365	38/365	1/126	2/126	9/492	106/492
陽性検体%	7.7%	43.0%	10.4%	0.8%	1.6%	1.8%	21.5%

(2) アフリカ大陸初の感染履歴を見出した LCMV 感染のリスク因子の解明

ヒト検体 281 検体からは LCMV ウイルス遺伝子は検出されなかったものの、動物検体 326 検体からはこれまでに報告のあった齧歯類 *Mus minutoides* (コビトハツカネズミ) に加え、*Lophuromys sikapusi* (アカハラブラシネズミ) またヤマアラシ、食虫目 (トガリネズミ) でも LCMV の遺伝子あるいはその抗体が検出された (表2)。PCR 陽性 RNA に対しては、シークエンスを試みたが宿主のリボソーム RNA の影響が強かったためか、配列は同定できなかった。ただし、各宿主のリボソーム RNA による非特異的増幅ではないことは確認できた。

以上の結果から、(1) で明らかにしたガボン共和国における LCMV 感染 (陽性率 21.5%) は、ヒト住環境周辺地域に身近な齧歯類や野生動物との接触がリスクに繋がることを明らかにした。この成果は国際学術誌に令和3年3月に論文として採択された (Ushijima et al., International Journal of Infectious Diseases, 2021)。

図: LCMV シュードウイルスを用いた中和試験

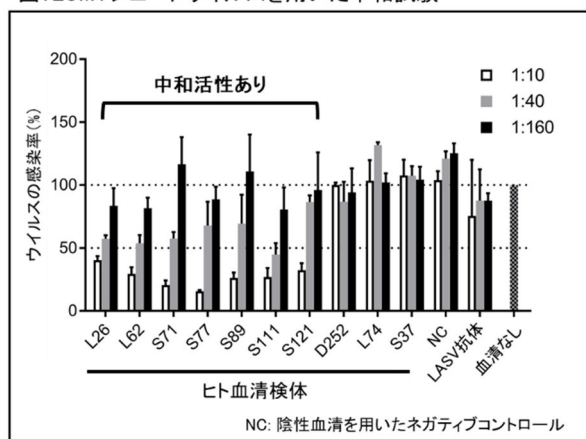


表2: 野生動物における LCMV の検出

野生動物 (一般名)	捕獲数	陽性	
		PCR	ELISA
げっ歯類			
ヤワゲネズミ	65	0	1
コビトハツカネズミ	41	0	3
クマネズミ	16	0	0
カオアカネズミ	6	0	0
オナガキヌゲネズミ	6	0	0
ヒトスジマウス	5	0	0
アカハラブラシネズミ	6	1	0
ホシフクサマウス	3	0	0
ハツカネズミ	3	0	0
ブラシネズミ	1	0	0
合計	152	1 (0.7%)	4 (2.7%)
食虫類			
トガリネズミ	129	0	3 (3.5%)
ブッシュミート			
ヤマアラシ	18	1	0
ダイカー	16	0	0
クチヒゲグエノン	6	0	0
アフリカオニネズミ	1	0	0
キノボリジャコウネコ	4	0	0
合計	45	1 (2.2%)	0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ushijima Y, Abe H, Ozeki T, Ondo GN, Mbadinga MJVM, Bikangui R, Nze-Nkogue C, Akomo-Okoue EF, Eila GWE, Koumba LBM, Nso BCBB, Mintsu-Nguema R, Makouloutou-Nzassi P, Makanga BK, Nguélet FLM, Zadeh VR, Urata S, Mbouna AVN, Massinga-Loembe M, Agnandji ST, Lell B, Yasuda J.	4. 巻 105
2. 論文標題 Identification of potential novel hosts and the risk of infection with lymphocytic choriomeningitis virus in humans in Gabon, Central Africa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 452 ~ 459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijid.2021.02.105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuri Ushijima, Haruka Abe, Georgelin Nguema Ondo, Rodrigue Bikangui, Chimene Nze Nkogue, Etienne Francois Akomo Okoue, Alfred Ngomanda, Marguerite M. Loembe, Selidji T. Agnandji, Bertrand Lell, and Jiro Yasuda
2. 発表標題 Epidemiological studies on viral diseases in Gabon
3. 学会等名 2nd African Congress for Clinical Trials（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------