

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

ケニアにおける黄熱病およびリフトバレー熱に対する迅速診断法の開発

とそのアウトブレイク警戒システムの構築

(ケニア)

平成 24 年度実施報告書

代表者：森田 公一

長崎大学 熱帯医学研究所・教授

<平成 23 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

ケニア及び東アフリカ諸国では蚊で媒介されるウイルスにより黄熱病やリフトバレー熱などの重篤な感染症のアウトブレイクが発生しており、その被害軽減のため自立/持続的に運用できる早期警戒・対応システムの構築が喫緊の課題である。本プロジェクトはこの問題解決のため、現地で採取した病原体を両国機関（ケニア中央医学研究所 KEMRI、長崎大学熱帯医学研究所）が共同で解析し、その情報に基づき当該国で利用可能な適正技術を用いた安価な診断用抗原を開発してフィールドや地方の診療所で使用できる簡易迅速診断手法を実用化する。さらに ODA により、上記両機関とケニア保健省が実施する社会技術開発を通して地方の医療機関と中央が迅速に連携できる、携帯電話網を利用した双方向型のネットワークを構築し末端での迅速診断の結果が国家レベルからの緊急疾病対策として適切に第一線へフィードバックされるアウトブレイク早期警戒システムモデルを構築する。

プロジェクト初年度である平成 23 年度は、平成 23 年 6 月に JST と長崎大学の仮契約が締結され、平成 24 年 1 月には本契約が結ばれ 3 月 31 日まで実施された。また ODA に関わる事業に関しては平成 23 年 12 月にケニア政府、JICA との間で RD が締結され、平成 24 年 3 月 1 日に JICA と長崎大学との事業契約が結ばれることにより開始された。当該期間中に実施計画にそって、長崎大学においては大腸菌発現系等を用いた黄熱ウイルスとリフトバレー熱ウイルスの抗原発現系を構築した。またケニアにおいてはレファレンス抗原の作製、黄熱病の遺伝子増幅検出技術(LAMP 法)を構築した。さらにウイルス検出系に用いる各種免疫抗体を作成した。この結果、初年度に予定した診断薬開発研究に関わる準備作業をすべて終了した。ODA で実施する予定の研究と技術移転に関してはその作業を初年度中(3月)に開始した。

プロジェクト 2 年次は精製ウイルス抗原製造態勢が KEMRI 製造部門にて既に確立され、組換え DNA 技術による野生ウイルス遺伝子 cDNA を用いた黄熱ウイルス VLP 抗原開発が完了した。また抗体およびウイルス検出用 POC テスト開発については IgM-Capture 法による試作キットが完成し、技術的な問題点が解決された。さらに KEMRI 本部と Alupe 支所の研究施設、機器の整備はほぼ予定通りに完了した。感染症早期警戒システムについては、公衆衛生省の担当部局との共同でシステムのデザインが完了し、携帯電話の SMS を利用して情報をやり取りするプログラムをストラスモア大学の協力で完了した。

2. 研究グループ別の実施内容

研究項目 1. 抗体検出用診断手法の開発

① 研究のねらい

黄熱、リフトバレー熱ウイルスに対する安価な診断抗原を遺伝子工学手法を用いて作製することにより安価な抗体検出のための POC test を開発する。また KEMRI に高度な抗体検出系を移転する。

② 研究実施方法

初年度には、大腸菌等の発現系を用いて、まず黄熱ワクチン株、リフトバレー熱ワクチン株ウイルスの Eタンパク、Nタンパクを試験的に小規模発現させ、次年度にケニア分離株を用いて実施する発現系の評価を行った。また、KEMRI においてはレファレンス抗体検査に利用する高純度のウイルス抗原を作製した。

2 年次は、ケニアの KEMRI 製造部門において黄熱ワクチン株ウイルスを大量培養して準備した精製抗原を用いた E L I S A法を作成した。長崎大学ではケニアに保存されていた過去の

黄熱ウイルス(YFV)野生株とリフトバレーウイルス(RVFPV)野生株の遺伝子を長崎大学に運搬し、YFV ケニア分離野生株のウイルス様粒子(VLP)および RVFPV のNタンパク質を発現し、この遺伝子工学により作成した抗原を KEMRI に運搬して現地の患者の血清を用いて評価した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

RVFPV 抗原については精製ウイルス抗原と大腸菌組換え抗原は同様の力価を示した(1-2-2)。YFV 抗原に関しては精製抗原の方が高い力価であり次年度には VLP 抗原の濃度を上げることとした。診断用各種抗体試薬の作製(1-3)に関しては長崎、ケニア双方で実施した(1-3-1), (1-3-2)。また金コロイド標識については KEMRI スタッフが日本の大塚製薬で技術習得をして、KEMRI 製造部門において実施中である(1-3-3)。POC テストキットの製造(1-4)に関しては、KEMRI の関連機器(大腸菌大量培養インキュベーター、凍結乾燥機その他)整備を実施する一方で、KEMRI の研修生が日本(長崎大学と大塚製薬)で YFV と近縁の日本脳炎ウイルス、デングウイルスを用いた系を作製し技術を KEMRI に移転した。KEMRI における ELISA 法の確立(1-5)については完了したので次年度に評価 (1-5-2)を実施する。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

初年度は、JST経費により来日した Mr. Allan Biwott Ole Kwallah に対して遺伝子発現技術の移転を実施した。

2 年次には JICA 経費により来日した Mr. Ferdinand Adungo に対して長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野にてウイルス分離の技術移転を実施し、Mr. Nicholas Ragot に対しては長崎大学熱帯医学研究と協力機関である大塚製薬(徳島市)においてイムノクロマト法開発の技術の移転を実施した。また、長崎大学熱帯医学研究所の井上助教は KEMRI に長期滞在し、本項目に関する技術移転を実施した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

日本において実施したイムノクロマト法の技術移転において今回、本プロジェクトでデザインした手法がデングウイルス、日本脳炎ウイルスにおいても利用可能であることが判明した。これらの疾患は我が国でも重要であり、将来的な波及効果が期待された。

研究項目 2. ウイルス検出用診断手法の開発

① 研究のねらい

黄熱、リフトバレー熱ウイルスに対する遺伝子検出法、イムノクロマト法によるウイルス抗原検出の POC test を開発する。また KEMRI に高度なウイルス検出系を移転する。

② 研究実施方法

初年度は黄熱ウイルスに対する LAMP 法を用いた遺伝子増幅検出法を共同開発した。さらに抗原検出のために黄熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルスに対する抗体をウサギを用いて作製した。

2 年次は、初年度作成した黄熱ウイルスに対する LAMP 法について黄熱ワクチン株だけでなくケニア野外株でも同様に検出できることを実証し国際誌に投稿し審査中である。その他、抗原検出のために黄熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルスに対する抗原検出サンドイッチ ELISA 法や抗体検出のために黄熱ウイルスおよびリフトバレー熱ウイルスのワクチン株をアッセイ抗原として用いた IgM-capture ELISA および IgG indirect ELISA を開発した。また POC テストの開発については KEMRI 研修員を日本に派遣し関連技術の開発を通して技術習得を実施

した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

KEMRI 本部の BSL-3 実験室の電源安定化、HEPA フィルター、空調修理などの改修工事が 8 月末に完了し、それまで電圧不安定のために実験時のみ短時間のみの運転していたのを 24 時間フル稼働できる態勢となった。さらに超低温冷凍庫を導入し、BSL-3 実験室内での高度危険病原体の管理が可能となった。さらには、KEMRI 製造部門に遺伝子解析機器が導入され、ウイルスの遺伝子検出および遺伝子配列解析が可能となった(2-1-1) (2-1-2)。また KEMRI ウイルス学部門 P2 実験室にリアルタイム PCR を設置し、黄熱およびリフトバレー熱の迅速診断が可能となった(2-1-3)。本プロジェクトのフォーカスポイントである西部地区およびコースト地区の 2 地区にて年間を通しての継続的な有熱患者の血清サンプリングを実施し、血清学的調査およびウイルス分離作業を実施した(2-1-4)。KEMRI-CIPDCR(Alupe)のアルボウイルスラボ (BSL-2 実験室) の整備作業は第一期工事が終了した。第一期工事終了後に機器を搬入し、本格的な稼働に入る。(2-2-1)。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

初年度は、JST経費により来日した Mr. Allan Biwott Ole Kwallahと共同で LAMP 法による遺伝子検出技術を開発しシステムは KEMRI において野生黄熱ウイルス株を用いて評価中である。

2 年次は、長崎大学熱帯医学研究所の余福勲助教が JICA 専門家として KEMRI 製造部を訪問して KEMRI ウイルス学部門のスタッフおよび本プロジェクトスタッフに対し、精製ウイルス抗原および遺伝子組換えウイルス抗原を用いての ELISA 法の技術研修を行った。また、長崎大学熱帯医学研究所の森田研究代表者は JICA 短期専門家として KEMRI カウンターパートに対してウイルス分離、遺伝子解析の技術移転を実施した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

ケニア-ソマリア国境から帰還した有熱患者から分離されたデングウイルス(YFV と近縁)の遺伝子解析を実施したが、その結果このウイルスはサウジアラビアで過去に分離されたウイルスと近縁であり、アラビア半島と東アフリカのヒトの往来によりウイルスも移動していることが示唆された。このことは本プロジェクトが 2 つの対象疾患に加えて他の蚊媒介性ウイルス(アルボウイルス、特にデングウイルスなど)の警戒態勢としても機能することを示唆しており、現在継続している患者血清の調査の感染症警戒態勢の一部としての有用性が示唆された。

研究項目 3. 警戒システムモデルの構築

① 研究のねらい

4 つのモデル地区、北部ウガンダ国境(ブシア地区)、西部地区、ナイロビ地区、コースト地区の第一線の医療施設とケニア保健省の担当部局を携帯電話網を活用して双方向性にネットワーク化して、アウトブレイク発生状況の把握と対応を迅速化することにより、流向の早期封じ込めを可能にするシステムモデルを構築する。

② 研究実施方法

公衆衛生省の感染症サーベイランス担当部署の DDSR(Division of Disease Surveillance and Response: 疾病対策課)と既存のシステムの整理および、今回構築する携帯電話を用いた警戒対応システムの組織づくりを実施し、あわせて携帯電話に搭載する専用ソフトウェアの開発を行った。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

公衆衛生省DDSRのカウンターパートと共同して本プロジェクトの感染症警戒システムモデル構築のためのワーキンググループを立ち上げた(3-1-1)。上記ワーキンググループにより感染症警戒システムモデル案を作成しその試験実施と有効性の評価のための実施する試験研究のプロポーザルを作成し、KEMRI の科学調査委員会承認を受けた。現在倫理委員会の審査中である(3-1-2)。また、計画システムで使用する携帯電話の SMS(ショートメッセージサービス)を利用したソフトウェアの開発をケニア国内の大学に委託し、プロトタイプが出来上がった。さらに、本警戒システムを実施するうえで不可欠である、公衆衛生省作成の指定感染症対策ガイドライン(全国の医療機関に配布する予定)の普及版ハンドアウト(原本)を作成した(3-1-3)。

本モデルシステムの有効性を調査し(ナイロビ近郊地区とブシア地区の 2 か所)実施時にワークショップにて配布する予定である配布用携帯電話について機種を選定した(3-1-4)。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

長崎大学職員の戸田みつるがJICA専門家としてケニアに長期滞在して計画システムの構築と疫学解析に関する技術移転を実施した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

公衆衛生省が指定感染症対策ガイドラインを新たに作成し、感染症情報システム開発を試みていた時期と重なり、本プロジェクトの事業が相乗的効果を期待できる展開となった。さらには当初計画では予想していなかった、保健情報システムのソフトウェア開発の実績を有するケニア国内の大学の参加が得られ、本プロジェクトが目指す感染症警戒システムモデルの開発および公衆衛生省内のサーバーの無償利用が可能となった。また、プロジェクト計画当初に比較して、開発途上国で IT(主に携帯電話網)を公衆衛生事業に活用する新学術領域「mHealth」が勃興する状況下で、本研究題目に関して東アフリカ地域はもとより世界の関連人材との連携が可能かつ必須となってきた。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 1 件)

② 本プロジェクト期間累積数(国内 0 件、国際 1 件)

③ 論文詳細情報

Inoue S, Wandera E, Miringu G, Bundi M, Narita C, Ashur S, Kwallah A, Galata A, Abubakar M, Suka S, Mohamed S, Karama M, Horio M, Shimada M, Ichinose Y.

”The NUITM-KEMRI P3Laboratory in Kenya: Establishment, Features, Operation and Maintenance.”

Trop Med Health, (2013) 41 (1) pp27-37.

(2) 特許出願

① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 0 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

③ 著作物詳細情報

なし

4. プロジェクト実施体制

①研究者グループリーダー名:森田公一(長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 教授)

②研究項目:

- 1) 抗体検出用診断手法の開発 (Output 1)
- 2) ウイルス検出用診断手法の開発 (Output 2)
- 3) 警戒システムモデルの構築 (Output 3)

以上