

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」

(相手国:ケニア共和国)

平成 25 年度実施報告書

代表者:森田公一

国立大学法人長崎大学・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概要

ケニア及び東アフリカ諸国では蚊媒介性の黄熱病(YF)やリフトバレー熱(RVF)など重篤な感染症のアウトブレイクが発生しており、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。本プロジェクトでは、ケニア中央医学研究所(KEMRI)と長崎大学熱帯医学研究所が共同で病原体を解析し、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、ケニア保健省の参画をえて、携帯電話網を利用した第一線の医療機関・施設と中央を結ぶ双方向型のアウトブレイク早期警戒システムモデルを開発し、この社会技術開発が感染症情報の迅速な伝達・処理を経て第一線へのフィードバック(緊急疾病対策)に役立つことを科学的に実証する。

プロジェクト初年度は、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た。また ODA 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 1 月 31 日を持ってプロジェクトが開始された。また、JICA と長崎大学との事業契約は平成 24 年 3 月 1 日付けで締結となった。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(YFV)とリフトバレー熱ウイルス(RVFL)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、YF の遺伝子増幅検出技術(LAMP 法)を構築した。

平成 24 年度は KEMRI 製造部門での抗原生産体制の整備、西部地域の KEMRI アルペ支所の施設整備を実施した。長崎大学では野生型 YFV の VLP(Virus Like Particle:ウイルス様粒子)抗原開発が完了した。また抗体およびウイルス検出用 POC(Point of Care:簡易)テスト開発については IgM 抗体検出の試作キットが完成し、技術的な問題点が解決された。感染症早期警戒システムについては、保健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(Short Message Service)を利用して情報をやり取りするシステムを作成し mSOS(mobile SMS-based disease outbreak alert system)と命名した。

平成 25 年度には KEMRI での診断用キット生産に必要な ISO 9001:2008 を取得した。製造部門においては RVFL に対する IgG 抗体検出系のイムノクロマト法製造法が可能となった。また、キット作成に不可欠の自前の各種モノクローナル抗体を樹立した。さらに、これまで外国の研究機関に依存していた YF の確定診断(中和試験)を KEMRI 内にて実施できるようになり、レファレンス機能が向上した。感染症早期警戒システムについては、mSOS の試験的運用によりプログラムを改良しつつ試験運用を継続し、システム評価を実施するパイロット地区でのベースライン調査が完了した。現在、予定どおり研究計画は進行している。

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

YF、RVFL 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

平成 23 年度には、大腸菌等の発現系を用いて、まず YFV ワクチン株、RVFL ワクチン株の 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。

平成 24 年度は、ケニアの KEMRI 製造部門において YFV ワクチン株を大量培養して準備した精製抗原を用いた ELISA 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 YFV 野生株と RVFV 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 VLP および RVFV 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。

平成 25 年度は、ケニアの KEMRI 製造部門において YFV は改良型 VLP、RVFV は N タンパクを用いた ELISA の評価を昨年度より多くの現地の患者血清を用いて実施した。さらに、長崎大学にて作出した抗 YFV モノクローナル抗体、抗 RVFV モノクローナル抗体を用いた IgM-capture ELISA、IgG 間接 ELISA の反応性を評価し、診断薬作製に用いることが可能であることが確認された。また、製造部門においては RVF の IgG 検出用イムクロマト(POC)テストを作製した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

RVFV 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。25 年度は、イムクロマト法キットの開発については KEMRI 製造部門にて精製ウイルス抗原を専用噴霧装置を用いてスティック状の試作品を製造し、ウサギ高度免疫血清でその反応性を確認するにいたった。現在、ヒト血清にて同様の反応性を確認作業中である。YFV 改良型 VLP 抗原ならびに RVFV N タンパク組換え抗原を用いて開発した ELISA 法を KEMRI ウイルス学部門の ELISA 法と比較して良好な結果を得た(1-5-2)。

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)

平成 23 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。

平成 24 年度には 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所および大塚製薬(徳島市)においてイムクロマト法開発の技術の移転を実施した。

平成 25 年度には JICA 経費により来日した Dr. Samson Limbaso Konongoi に対して長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野にて中和試験の技術移転を実施した。また、平成 23 年度から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ている。

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)

平成24年度に日本において実施したイムクロマト法の技術移転において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が、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。

平成25年1月、日本において RVFV と近縁の重症熱性血小板減少症ウイルス(SFTSV)感染者が確認され(平成25年中に数十名の患者が確認された)、長崎大学では平成25年4月に本プロジェクトで開発した遺伝子工学手法による発現 N 蛋白を用いる診断系を応用して、短期間に SFTS の血清診断法を開発し地域での迅速診断に貢献した。このことは本プロジェクトが日本の感染症対策にも間接的に寄与した事例であると考えられる。一方、平成25年3月には、ケニアにデング熱の流行が海岸地域で発生し多くの患者が発生した。今後、ケニアにおいても、黄熱病と近縁であるデングウイルスのイムノクロマト法およびELISA診断キットの必要性が高まるものと思われる。

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

YFV、RVFV 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

平成 23 年度は YFV 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 YFV、RVFV に対する抗体を、ウサギを用いて作製した。

平成 24 年度は、平成 23 年度作成した YFV 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掲載された。その他、抗原検出のために YFV、RVFV に対する抗原検出サンドイッチ ELISA 法、IgM 抗体検出のために YFV および RVFV のワクチン株の感染培養液をアッセイ抗原として用いた IgM-capture ELISA、IgG 抗体検出のために YFV および RVFV のワクチン株の精製ウイルスをアッセイ抗原として用いた 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。

平成 25 年度は、長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野にて YFV と RVFV への自前のモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は長崎大学ケニア拠点にてそれぞれのウイルスのワクチン株並びにケニア野生株感染細胞を用意し、KEMRI 製造部門(鏡検は KEMRI 研修センターにて実施)にて蛍光抗体法でこれらのウイルスを特異的に検出できることを確認した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

平成 24 年度には KEMRI 本部の BSL-3 実験室の電源安定化、HEPA フィルター、空調修理などを完了し、24 時間フル稼働できる体制となった。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、YF および RVF の迅速診断が可能となった(2-1-3)。さらに西部地域およびコースト地域の 2 地区にて年間を通して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(アルペ支所内)のアルボウイルスラボ(BSL-2 実験室)の整備作業は第一期、第二期工事共に終了し、同年 5 月より本格的な稼働に入った(2-2-1)。

平成 25 年度には、KEMRI ウイルス学部門の Dr. Rosemary Sang および Dr. Fred Eyase との共同で蚊から RVFV ケニア株の分離に成功した。(2-1-3)。また、本プロジェクトのフォーカルポイントであるコースト地域(モンバサ)で2013年3月に発生したデング熱の流行でもデングウイルスの分離及びそ

の遺伝子解析、系統樹解析を行い分子疫学情報を保健省機関に提供した(2-1-4)。また、KEMRI-CIPDCR(アルペ支所内)のアルボウイルスラボ (BSL-2 実験室) も平成 25 年 6 月に開室式を挙行し、レファレンスラボとして YFV 及び RVFV 抗体調査の ELISA および中和試験などを実施した(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)

平成 23 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 YFV 株を用いて評価し好結果を得た。

平成 24 年度は、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 製造部門を訪問して 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。

平成 25 年度は、長崎大学熱帯医学研究所の余福勲助教が JICA 短期専門家として 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、モノクローナル抗体作出法の実地指導(細胞融合、スクリーニング、蛍光抗体法等)を行った。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。また、平成 24、25 年度の 2 回、KEMRI 製造部門スタッフの Mr. Allan Biwott Ole Kwallah は隣国ウガンダのウガンダ国立ウイルス学研究所(UVRI)に出張し、黄熱の迅速遺伝子診断法である RT-LAMP 法および血清診断法の IgM-capture ELISA を実地指導して、共同研究を通して、南南協力による技術移転をおこなった。また、KEMRI 職員で長崎大学博士課程在籍中の Mr. Ferdinard Adungo へは長崎大学熱帯医学研究所で実施中の本研究項目についての研究を通して技術移転も実施されている。平成 23 年度から引き続き、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ている。

- 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。さらにはコースト州立総合病院(モンバサ市)にて定期的に採集している有熱病患者血清から抗デング IgM 抗体が検出され、デング熱の発生が確認された。これら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。

平成 25 年度は、上記モンバサのデング熱患者からデングウイルスの分離に成功し、分子系統樹解析の結果、サウジアラビア分離株に近縁であることが判明し、血清疫学調査の結果と総合して、既にコースト地域にデングウイルスが定着していることが示唆された。

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、西部地域ウガンダ国境(ブシア地区)、北東部地域、ナイロビ地域、コースト地域の

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、流行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

保健省の感染症サーベイランス担当部署である DSRU (Disease Surveillance and Outbreak Response Unit: 疾病対策課: 平成 25 年の組織改組以前は DDSR) 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う。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

平成 24 年度には保健省 DSRU 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に実施する試験研究のプロポーザルを作成し、KEMRI の科学調査委員会及び倫理委員会の承認を受けた。また、臨床試験国際データベースにも登録を完了した(3-4)。システムで使用する携帯電話の SMS を利用したソフトウェアの開発をケニア国内の大学と共同で実施し、ソフトウェアを作製した(3-1-2)。平成 25 年度には、前年度から作成中であり、本警戒システムを実施するうえで不可欠である、保健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)および mSOS 操作法マニュアルの作成を完了し、パイロット導入先で配布した(3-1-3)。また、システム導入ワークショップに使用する配布用携帯電話を購入し、パイロット導入先で配布した(3-1-4)。ナイロビ市内保健施設におけるプロタイプテストを実施した後、パイロット導入地域(西部地域ブシアおよびナイロビ近郊カジアド)で試験運用を開始した(3-2-1)。本モデルシステムの有効性を調査するにあたり、ベースライン調査をパイロット導入地域で完了した(3-3、3-4)。

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)

平成 24 年度より継続して、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計画システムの構築(ストラッスマア大学専門家 4 名)、疫学解析(モイ大学生 3 名)、データ入力・管理(大学生 2 名)、ベースメントサーベイ(DSRU 職員数名)に対する技術移転を実施した。

平成 26 年 1 月 15 日から 3 月 8 日まで Ms. Deborah Mogo (保健省 DSRU のスタッフ) が JICA 課題別研修プログラム「地域保健システム強化による感染症対策(C)」にて沖縄県(沖縄国際センター)で研修を受けた。

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)

保健省が指定感染症対策ガイドラインを新たに作成し、コンピューターを使った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の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保健省内のサーバーの無償利用が可能となった。プロジェクト計画当初に比較して、発展途上国、特にケニア近隣国での m-Health (mobile health: 携帯電話端末を使った医療保健分野の取り組み) の活動が盛んで、この傾向は 2013 年 2 月にナイロビで開催された Mobile Health Africa Congress や同年 3 月にルワンダで行われた East African Epidemiology Symposium および East African Community

Annual Health and Scientific Conference にても活発に m-Health について討議、発表されていた。また、ここ数年の国際誌上に発表される m-Health 関連論文数も増加しており、新学術領域として勃興している印象を受けた。このように開発途上国で 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。また、保健省が根拠に基づいた健康政策を希望した事からランダム化比較試験を用いた早期警戒システムの有効性、インパクトを評価研究するプロポーザルを作成し、ベースライン調査とエンドライン調査を行うことが可能となった。平成 25 年度は DSRU 外部評価レポート(MEASURE Evaluation コンサル会社著)に mSOS システム活用を推奨する記載がされた。また、平成 26 年 3 月に発生した赤痢と思われる消化管感染症の流行において mSOS が流行発生の探知に効果があったことが示された。

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 2 件)

③ 論文詳細情報

1) 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 P3 Laboratory in Kenya : Establishment, Features, Operation and Maintenance.”

Trop Med Health, (2013) 41 (1) p27-37.

2) Kwallah A O, Inoue S, Muigai A W T, Kubo T, Sang R, Morita K, Mwau M.

“A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus.”

J Virological Methods, (2013) 193, pp23-27

(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)

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

2)ウイルス検出用診断手法の開発

3)警戒システムモデルの構築

以上