

THE CHEMICAL TIMES

2023 No.2 (通巻268号)
ISSN 0285-2446

特集

新興・再興感染症 —ウイルス—

02 新型コロナウイルス感染症の検査法

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員 山岡 悠太郎

08 我が国におけるデング熱の現状と対策

東京都健康安全研究センター 微生物部 部長 貞升 健志

15 2022年サル痘ウイルス感染症の 世界的大規模流行の背景と対策

札幌市保健福祉局・保健所 医療政策担当部長 西條 政幸

21 ダニ媒介性脳炎治療法開発のための核酸アナログによる ウイルス増殖抑制機序に関する研究

長崎大学 高度感染症研究センター研究部門 ウイルス生態研究分野 教授 好井 健太郎

26 未知のウイルスを発見し、パンデミックを未然に防ぐ

東京農工大学農学部附属 感染症未来疫学研究センター センター長 / 教授 水谷 哲也



KANTO CHEMICAL CO., INC.

新型コロナウイルス感染症の検査法

Diagnostics for COVID-19

山岡 悠太郎
Yutaro Yamaoka

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所(研究員)
Life Science Laboratory, Technology and Development Division, Kanto Chemical Co., Inc. (Researcher)

KEYWORD ▶ 新型コロナウイルス 変異 検査法

はじめに

01

新型コロナウイルス(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2:SARS-CoV-2)による新型コロナウイルス感染症(Coronavirus disease 2019:COVID-19)のパンデミックは4年目を迎え、2023年1月現在、世界での感染者数は6億人、死者数は650万人を超えた。コロナ渦により、ニュースや新聞でPCRや抗原検査が取り上げられたり、医療現場以外でも検査が行われるようになったりと、検査が我々の日常に非常に身近なものとなった。本稿では、本ウイルスの発生状況や変異等について概説するとともに、検査法に焦点を当てて詳述し、当社が開発に取り組んできた抗原検査用のモノクローナル抗体についても紹介したい。

SARS-CoV-2はコウモリコロナウイルスとの相同性が高く、またセンザンコウのコロナウイルスと一部の配列が類似することから、これらがSARS-CoV-2の祖先である可能性が考えられているが、自然宿主や中間宿主等の正確な起源については未解明である¹⁾。

SARS-CoV-2のウイルス粒子は直径100 nm~200 nm程度である。その外殻はスパイクタンパク質(Spike Protein:SP)、メンブレンタンパク質、エンベロープタンパク質、そして脂質二重膜から構成され、内部にはゲノムRNAとそれに対してらせん状に結合したヌクレオカプシドタンパク質(Nucleocapsid Protein:NP)を有している。

ゲノムRNAの大きさは約30,000塩基であり、同じRNAウイルスであるインフルエンザウイルス(約14,000塩基)やノロウイルス(約7,500塩基)等と比べても非常に大きい。ゲノムの5'末端にはキャップ構造、3'末端にはポリA鎖が付加されており、計29個のタンパク質がコードされている²⁾。その内訳は、4個がウイルス粒子を構成する構造タンパク質であり、残りの25個がウイルスRNAの複製や宿主の免疫応答の阻害等、ウイルスの生存に重要な役割を果たす非構造タンパク質あるいはアクセサリタンパク質である。

SARS-CoV-2の分類と構造

02

SARS-CoV-2はプラス鎖の一本鎖RNAをゲノムとするウイルスであり、ニドウイルス目コロナウイルス科ベータコロナウイルス属に分類される。コロナウイルスは、1949年に最初のウイルスが発見されて以来、ヒトだけでなくネコやマウス、コウモリ等の哺乳動物や鳥類に感染するもの等、様々な種類が見つかっている。この中でヒトに感染するヒトコロナウイルス(Human Coronavirus:HCoV)は計7種類存在する。まず、主症状として感冒を引き起こすのがHCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1の4種類であり、これらは冬季の風邪の10%~15%程度の原因とされる。これらに加え、2002年に中国広東省で発見され、致死率約10%の重症急性呼吸器症候群(Severe acute respiratory syndrome:SARS)を引き起こすSARS-CoV、2012年にサウジアラビアで発見され、中東呼吸器症候群(Middle East Respiratory Syndrome:MERS)の原因となるMERS-CoV、そして今回のSARS-CoV-2の3種類である。

本邦での感染者数、SARS-CoV-2の変異の状況

03

1. 国内の感染者数

本邦では2020年1月16日に国内1例目の感染者が報告されて以来、感染者数のピークの波は8回目を迎え、2023年1月3日の時点で全人口の約23.3%に相当する累計29,110,107人の感染者数、57,944人の死亡者数が報告されている(図1)³⁾。ただし、この感染者数には複数回感染した人も含まれており、また、症状が出て検査していない人の数は含まれていない。一方、国立感染症研究所が2022年11月に実施した献血者の血液における抗体保有割合の調査によると、献血者の28.6%がSARS-CoV-2

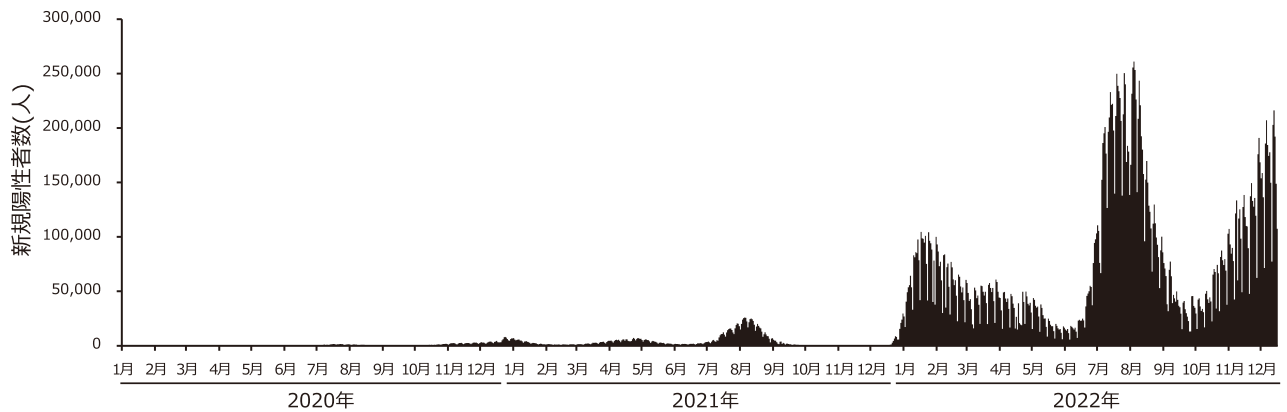


図1 国内のCOVID-19新規陽性者数の推移
2023年1月3日時点の厚生労働省発表データ³⁾より作図

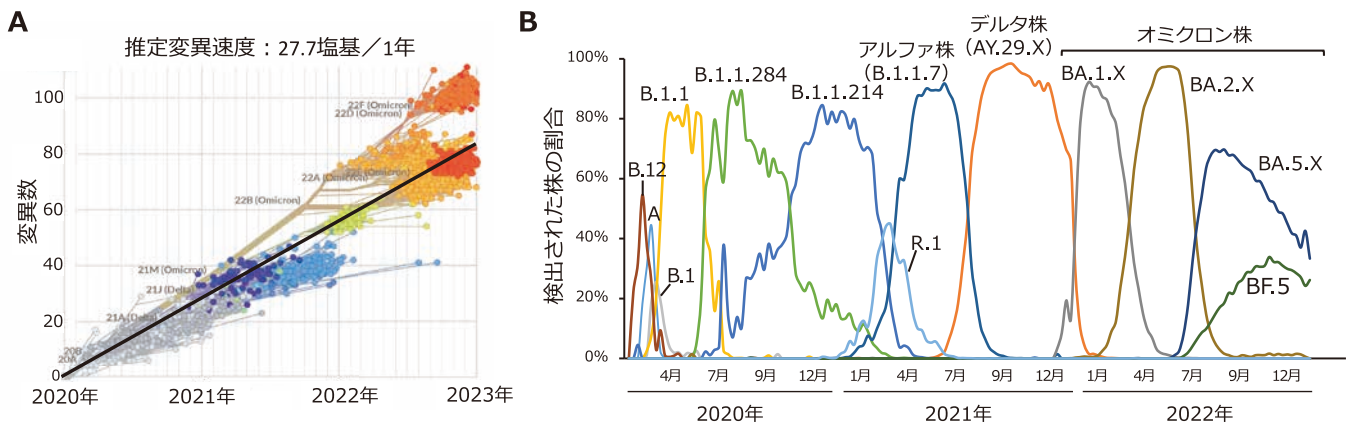


図2 SARS-CoV-2の変異の状況

(A) SARS-CoV-2のゲノムにおける変異数の時系列変化 (Nextstrainより一部改変して引用⁵⁾)

(B) 国内における主要な株の推移 (2023年1月3日時点の国立感染症研究所発表データ⁶⁾より、各時点での検出割合が25%以上となった株を抽出して作図)

に対する抗体を保有していることが報告されている⁴⁾。抗体検査の感度、抗体の陽転率、検体提供者の偏り等に留意する必要があるが、既に国民の約3割以上が感染した可能性がある。

2. ウイルスの変異

一般的にRNAウイルスはゲノムRNAを複製する酵素の正確性が低いため変異が入りやすい。一方、SARS-CoV-2等のコロナウイルスは複製酵素だけでなく校正酵素も合わせ持つため、他のHIVやインフルエンザウイルス等と比べると変異速度は比較的遅い。この観点から、当初は変異が大きな問題となる可能性は低いとの見方もあったが、実際には世界的な流行拡大により、ウイルスの感染性・伝搬性を上昇させ、ワクチンや中和抗体製剤からの免疫逃避能を獲得した種々の変異株が出現した。現時点での平均変異速度は、27.8塩基/ゲノム/1年間であり、プロトタイプの株と比べて、現在の分離株ではゲノムに70塩基～

100塩基程度の変異が生じている(図2A)⁵⁾。また、世界共通の系統分類法であるPANGOLIN (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages)によると、SARS-CoV-2は2023年1月4日時点で2,347個の系統に分類されている⁶⁾。WHOは、公衆衛生上で懸念されるウイルス株をVOC (Variant of Concern)と位置付けており、これまでに、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、オミクロンの5つが指定された(現在オミクロン以外は指定解除)⁷⁾。これらの変異株は、感染力が增強した新たな株が出現するたびに置き換わっている。本邦では、プロトタイプ由来の系統の株(A、B.1等)から始まり、SPIにD614G変異を持つ通称欧州型(B.1.1)、そこから派生したB.1.1.284やB.1.1.214、アルファ株、デルタ株、オミクロン株と流行株が変遷してきた(図2B)⁸⁾。2022年以降はオミクロン株の亜系統である、BA.1系統、BA.2系統、そしてBA.5系統と推移しており、現在検出されているウイルスはほぼ全てオミクロンの亜系統である。

COVID-19の検査法

04

1. 検査法全般

COVID-19に関連した検査法は、主に①遺伝子検査法、②抗原検査法、③抗体検査法の三つが挙げられる。遺伝子検査法と抗原検査法はSARS-CoV-2由来の核酸・抗原タンパク質を直接検出する検査法であり、COVID-19の確定診断に用いられる。一方、抗体検査法はSARS-CoV-2に対して産生される抗体を検出するものであり、感染の既往歴やワクチン接種による抗体価の確認等に使用され、診断法としての活用は推奨されていない⁹⁾。図3に感染者におけるウイルス量の推移と各検査で陽性となる期間の推定図を示した^{10,11)}。遺伝子検査法は、少量のウイルスであっても検出できるため、発症前から回復後まで幅広く用いることができる。抗原検査法は、遺伝子検査法と比べて一般に感度が低いため、陽性となる期間はやや短いと考えられている。抗体検査法は、発症から10日程度が経過してから陽性となり始める。

本邦においては、2020年1月に国立感染症研究所が設計したプライマーやプローブに基づいた遺伝子検査法が整備された。2020年3月にリアルタイムPCR法を原理とした検査試薬が体外

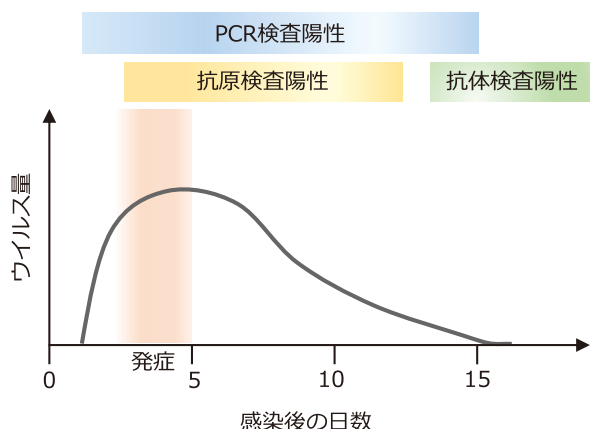


図3 感染後のウイルス量と各検査法で陽性となりやすい期間オミクロン株での推定図、文献^{10,11)}を参考に作図

診断用医薬品として初めて承認され、本感染症のゴールドスタンダードの検査法として活用されている。抗原検査法については、2020年5月に最初の抗原検査試薬が承認され、その後普及が進んでいるものの、全体の検査数に占める割合としては24%程度に留まっている(図4)^{12,13)}。

2. 検査に用いられる検体の種類

SARS-CoV-2は、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、唾液等の気道または口腔由来の検体の他、血液、便、尿等から検出される。確定診断のための検体としては主に前者の検体が用いられ、後者は重症度や病態の解明等の研究目的で用いられることが多い。なお、抗体検査では主に血液由来の検体が用いられている。SARS-CoV-2は上気道から感染するため、感度の高い(ウイルス量の多い)検体は鼻咽頭拭い液であるとされ、最も標準的で信頼性の高い検体として活用される。一方、鼻咽頭拭い液は自己採取が難しいため、医療従事者が検体を採取する必要があり、採取時の感染リスクも高い。鼻腔拭い液は自己採取が可能であるものの、鼻咽頭拭い液と比べるとやや感度に劣るとされ、系統的レビューでは鼻咽頭拭い液の遺伝子検査法における感度が98%であったのに対し、鼻腔拭い液の感度は82%~88%であったとの報告がある¹⁴⁾。唾液も自己採取が可能であるが、感度に影響が出る恐れがあるため、飲食や歯磨き、うがい直後の採取は避ける必要がある。唾液についても鼻咽頭拭い液と比べてやや感度に劣ることが報告されている^{15,16)}。

3. 遺伝子検査法

遺伝子検査法は、SARS-CoV-2に特有の遺伝子領域を増幅して検出するものであり、感度・特異度共に極めて高い検査法である。2023年1月12日の時点で48種類の試薬が体外診断用医薬品として承認され、その原理は主にリアルタイムPCR法と等温遺伝子増幅法に大別される¹⁷⁾。検体から核酸抽出試薬を用いてゲノムRNAを抽出し、これを試料とするのが一般的であるが、検査工程を簡略化するため検体と前処理液を混合して熱処理したものを試料とする試薬も多く市販されている。

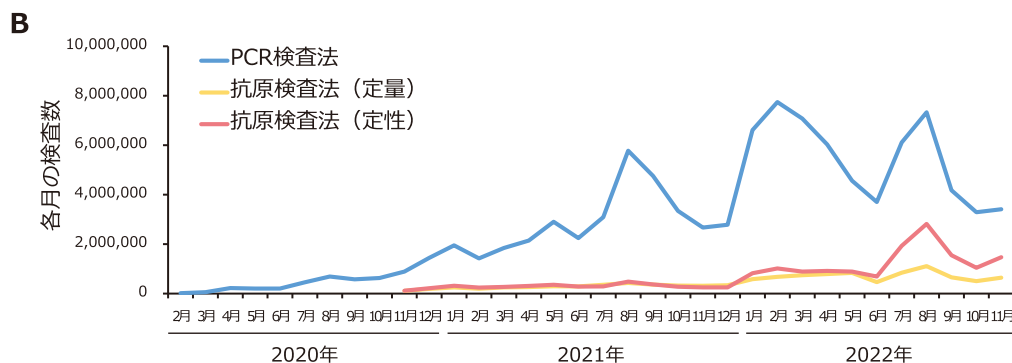
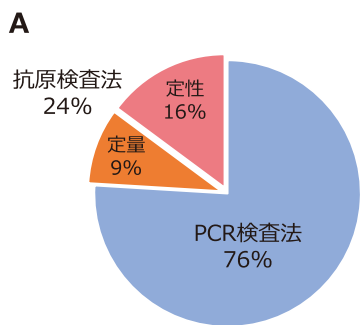


図4 国内のCOVID-19検査の実施状況
(A) PCR検査法、抗原検査法の実施数の割合
(B) 各検査法の実施数の推移
いずれも厚生労働省発表データ^{12,13)}を基に算出、作図

リアルタイムPCR法の標的となる遺伝子領域として、国立感染症研究所が当初に設計した領域はヌクレオカプシド(Nucleocapsid:N)遺伝子であったが、各国では、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RNA dependent RNA polymerase: RdRp)遺伝子、エンベロープ(Envelope:E)遺伝子等、異なる領域を標的としており、各社から市販されている試薬の標的は様々である。測定には蛍光を検出するリアルタイムPCR装置が必要であり、結果判定までに2時間～3時間を必要とする。また、微量の試薬や検体を取り扱う必要があるため、測定操作にはある程度の熟練が必要である。加えて、コンタミネーションによる偽陽性事例も多く発生しているため、陽性コントロールや測定済みサンプルの廃棄法についても留意する必要があることや、試薬が比較的高価である等、課題も多い。全ての検査工程を全自動で行う全自動PCR装置や、他の呼吸器ウイルスとの鑑別を同時に実施できるキットも市販されている。

等温遺伝子増幅法には、LAMP法(Loop-mediated Isothermal Amplification)、SmartAmp法、TMA法(Transcription Mediated Amplification)、TRC法(Transcription Reverse-transcription Concerted reaction)等があり、各手法により原理は異なるが、いずれも温度変化を伴わずに一定温度で遺伝子を増幅し、30分～60分と比較的短時間で結果を得ることができる。感度はPCR法と比べてやや劣るとされ、検体種によっては、非特異的反応が生じる場合があることも報告されている⁹⁾。

ウイルスの変異に対しては、プライマーやプローブの認識領域に変異が入ることで感度が低下した事例も一部報告されているが、変異の入りづらい領域や複数の領域を標的にする等の対策が各社で行われており、これまでのところ大きな問題にはつながない¹⁸⁾。

4. 抗原検査法

抗原検査法は、抗体を用いてウイルスの抗原タンパク質を特異的に検出する検査法である。抗体にはウイルス粒子の中で最も量が多い抗原タンパク質であるNPを認識するものが主に用いられる。抗原検査法は、大型な機器を用いて抗原量を定量する抗原定量検査法と、簡便な操作で抗原の有無を判定する抗原定性検査法の2種類に大別される。2023年1月12日の時点で、抗原定量検査法は8種類、抗原定性検査法は55種類の試薬が体外診断用医薬品として承認されている¹⁷⁾。また、抗原定性検査法はOTC医薬品としても活用されている。

抗原定量検査法は、化学発光酵素免疫測定法や電気化学発光免疫測定法等が主な原理として用いられている。測定時間が20分～50分と短く、1時間当たり100テスト～200テストを全自動で検査することができる。比較的大型の装置が必要となるが、全自動で多検体を迅速に測定可能というメリットから、主として大病院や検査センター、空港検疫等で活用されている。適用可能な検体は各試薬で異なるが、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液に加えて、唾液を用いることができる試薬も存在する。遺伝子検査法と比べると感度や特異度はやや劣り、オミクロン株では発症前の検出

率が低いという報告もなされている¹⁹⁾。

抗原定性検査法は、イムノクロマト法が主な原理として用いられ、キット単体で試験可能な試薬と検査に小型の機器を要する試薬の2種類がある。試験開始から数分～30分以内に判定結果が得られ、検査に特別な技術を必要とせず、誰でも試験が可能であり、一般に遺伝子検査法より低コストであるというメリットがある。しかしながら、遺伝子検査法と比べて感度・特異度は劣り、系統的レビューでは、遺伝子検査法と比べて感度は70.6%、特異度が98.9%程度という報告例もある²⁰⁾。また、体外診断用医薬品として承認済みの試薬は同等の感度・特異度を有するものとして扱われるが、ウイルスの培養液を検体とした際の検出下限には性能差があることも報告されている²¹⁾。本邦においては、発症から9日目以内の有症状者が確定診断の対象であり、発症から10日目以降の有症状者や無症状者は、陰性の場合でも必要に応じて遺伝子検査や抗原定量検査を行うことが推奨されている。また、無症状者に対するスクリーニング目的での使用も可能であるが、確定診断としての使用は推奨されていない。

抗原検査法の標的であるNPは、SPと比べて変異が入りづらいものの、一部のアミノ酸には変異が認められており、抗原検査法の検出能が低下する場合があることも報告されている²¹⁾。

5. 抗体検査法

抗体検査法は、感染者またはワクチン接種者の血液中に産生されるウイルスに対する抗体を検出するものである。SARS-CoV-2のSPまたはNPが固相化された担体を用いて、これに結合する抗体を定量的に検出する化学発光酵素免疫測定法の試薬や、定性的に検出するイムノクロマト法の試薬等が市販されている。また、ウイルスの感染を阻止する「中和抗体」の測定に関しては、感染能のあるウイルスを用いる古典的な方法に加えて、偽ウイルスや疑似ウイルス粒子を用いた細胞系による測定法と、SPと感染受容体との結合阻害活性を測定する方法等がある。これらの抗体検査法は、パンデミックの初期には遺伝子検査法や抗原検査法の結果を補足する検査としての活用も検討されていたが、抗体は発症後10日前後が経過してから産生されるため、急性期の診断には使用することができない。

現在普及しているワクチンはSPを標的としているため、ワクチン接種後の抗体価測定にはSPに対する抗体検査法が、感染既往歴や疫学調査目的にはNPに対する抗体検査法が主に用いられている。NPに対する抗体検査法は、無症候者、軽症例、ワクチン接種者で抗体価が十分上昇しない場合があることや、SPと比べてNPの抗体価は低下しやすいという研究報告がある点に留意する必要がある^{23, 24)}。

当社が取り組んできた抗原検査用の
モノクローナル抗体開発

05

抗原検査試薬の性能は、その原料に用いるモノクローナル抗体の品質に大きく左右される。しかし、抗体の認識部位や、HCoVに

対する交差反応性、種々の変異株に対する反応性等が開示されていない抗体原料も数多く流通しているのが実情である。また、4-4項にて述べたように、NPの変異により抗体の反応性が変わる可能性も指摘されている。当社は、横浜市立大学 医学部 微生物学の梁 明秀 教授(現:国立感染症研究所 ウイルス第三部 部長)との共同研究を通じて、SARS-CoV-2の出現直後からウイルスの情報を入手し、SARS-CoV-2を特異的に認識し、抗原検査法に活用できる高性能な抗体の開発に取り組んできた。下記ではその開発の概要について紹介する。

我々は、NPのアミノ酸配列の中で他のHCoVと相同性が高いモチーフを除いた部分タンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により大量に調製した。これを免疫原としてマウスに接種し、抗NP抗体を産生するハイブリドーマクローンを作製した。NPに対する抗体の親和性と特異性を指標にクローンのスクリーニングを行い、SARS-CoV-2を特異的、かつ高親和に結合するモノクローナル抗体を複数樹立することに成功した²⁵⁾。また、

それらの抗体の性質を詳細に解析し、抗体の認識部位がSARS-CoV-2の変異株間では保存されており、一方で類縁のHCoVとは相同性が低い領域であることを明らかにした²⁵⁾。そして、それらの抗体を組み合わせることで、SARS-CoV-2を高感度に検出可能なサンドイッチELISAを構築した。このELISAの特異性を検証したところ、SARS-CoVを含む他の類縁のHCoVや、ライノウイルス、RSウイルス、インフルエンザウイルス等とは交差反応性を示さず、SARS-CoV-2のみを特異的に検出可能であった(図5A)。一方、SARS-CoV-2の変異株であるオミクロン株については、従来株とほぼ同等に検出可能であった(図5B)。さらに、本抗体はイムノクロマト法による抗原検出に応用できることも検証した(図5C)。

我々は、新たな変異株が出現する度にそのNPの配列を解析し、抗体認識部位の変異の有無を検証している。幸いなことに、これまで出現した株では抗体認識部位に顕著な変異は確認されていない(図6)⁵⁾。

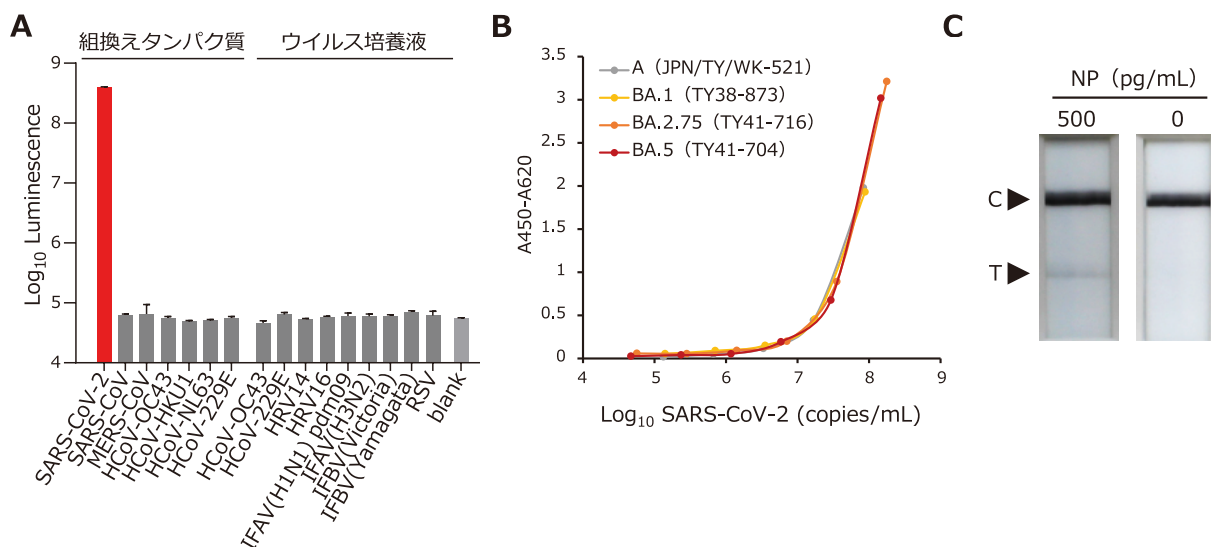


図5 開発した抗体の性能

(A) 文献(25)を和訳して引用。COVID-19のPCR陰性プール鼻咽頭拭い液検体に各ウイルスのNPの組換えタンパク質、または各ウイルスの培養液を加えて疑似検体を作製し、開発抗体を用いたELISAで分析した²⁵⁾。

HCoV-229E (ATCC VR-740)、HCoV-OC43(ATCC VR-1558)、ヒトラノウイルス14(HRV14, ATCC VR-284)、ヒトラノウイルス16(HRV16, ATCC VR-283)、RSウイルス (RSV, ATCC VR-26)、インフルエンザウイルスA(IFAV) (H1N1)pdm09(A/Yokohama/72/2020)、IFAV (H3N2)(A/Yokohama/68/2020)、インフルエンザウイルスB (IFBV) Victoria系統(B/Yokohama/33/2020)、インフルエンザウイルスB Yamagata系(B/Yokohama/35/2019)

(B) SARS-CoV-2の各変異株のウイルス培養液を段階希釈した検体を、開発抗体を用いたELISAで分析した。

(C) 開発抗体を用いてイムノクロマトキットを試作し、組換えタンパク質として調製したSARS-CoV-2のNPを添加して分析した。

C:コントロールライン、T:テストライン

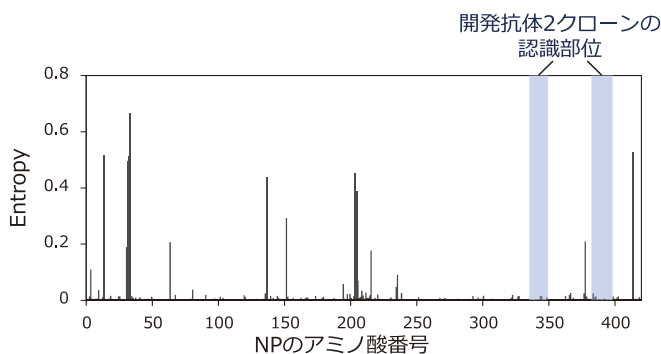


図6 開発抗体の認識部位とNPの変異
Nextstrainのデータを基に作図⁵⁾

本稿では、COVID-19の検査法に焦点を当てて概説した。COVID-19は、世界中の医療従事者、研究者の献身により、ワクチン、抗ウイルス薬、検査法等が過去に類を見ないスピードで整備されて普及が進んできた。しかしながら、SARS-CoV-2はそれに対抗するかのように変異を繰り返しており、いまだ収束の目途はたっていない。今後も人類と本ウイルスの戦いはしばらく続くと思われるが、当社も自社開発した抗体の有効性の検証は継続しつつ、変異株に対してより親和性の高い抗体や、より高感度な検査法を新たに開発することで、微力ながら社会に貢献していきたいと考えている。

参考文献

1. Spyros Lytras, Joseph Hughes, Darren Martin, Phillip Swanepoel, Arné de Klerk, Rentia Lourens, Sergei L Kosakovsky Pond, Wei Xia, Xiaowei Jiang and David L Robertson. Exploring the Natural Origins of SARS-CoV-2 in the Light of Recombination. *Genome Biol Evol.* 2022, 14, 2, e018.
2. Can-rong Wu, Wan-chao Yin, Yi Jiang and H. Eric Xu. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2022, 43, 3021-3033.
3. 厚生労働省, データからわかる—新型コロナウイルス感染症情報—, <https://covid19.mhlw.go.jp/extensions/public/index.html> (参照 2023-01-03)
4. 国立感染症研究所, 2022年11月における献血検体を用いた既感染割合に関する分析. <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/82/covid19-82.pdf> (参照 2023-01-12)
5. Nextstrain, Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6 months, <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m?l=clock> (参照 2023-01-12)
6. PangoNetwork, Lineage List, https://cov-lineages.org/lineage_list.html (参照 2023-01-04)
7. WHO, Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (参照 2023-01-04)
8. 国立感染症研究所, 新型コロナウイルス ゲノムサーベイランスによる国内の系統別検出状況 (csv), https://www.niid.go.jp/niid/images/cepr/covid-19/20230103_genome_weekly_lineageJAPAN.csv (参照 2023-01-12)
9. 病原体検査の指針検討委員会, 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 第6版.
10. O. Puhach, Benjamin Meyer and Isabella Eckerle. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol.* 2022. doi:10.1038/s41579-022-00822-w.
11. Rosanna W Peeling, David L Heymann, Yik-Ying Teo and Patricia J Garcia. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *The Lancet.* 2022, 399, 757-768.
12. 厚生労働省, 国内における新型コロナウイルスに係る抗原検査 (検体採取) の実施状況 (検体採取日ベース). <https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/001033867.pdf> (参照 2023-01-12)
13. 厚生労働省, 国内における新型コロナウイルスに係るPCR検査の実施状況. <https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/001034409.pdf> (参照 2023-01-12)
14. Yaolin Zhou and Timothy J. O'Leary. Relative sensitivity of anterior nares and nasopharyngeal swabs for initial detection of SARS-CoV-2 in ambulatory patients: Rapid review and meta-analysis. *PLoS One.* 2021, 16, e0254559.
15. Beathe K. Granerud, Thor Ueland, Andreas Lind, Arne Søråas, Børre Fevang, Anne Katrine Steffensen, Huda Al-Baldawi, Fridtjof Lund-Johansen, Pål Aukrust, Bente Halvorsen, Tuva B. Dahl, Susanne Dudman, Fredrik Müller and Jan Cato Holter. Omicron Variant Generates a Higher and More Sustained Viral Load in Nasopharynx and Saliva Than the Delta Variant of SARS-CoV-2. *Viruses.* 2022, 14, 11, 2420.
16. Rose A. Lee, Joshua C. Herigon, Andrea Benedetti, Nira R. Pollock and Claudia M. Denkinger. Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2021, 59, 5, e02881-20.
17. 厚生労働省, 新型コロナウイルス感染症の体外診断用医薬品 (検査キット) の承認情報 (2022), https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_11331.html (参照 2023-01-12)
18. Food and Drug Administration, Genetic Variants of SARS-CoV-2 May Lead to False Negative Results with Molecular Tests for Detection of SARS-CoV-2 - Letter to Clinical Laboratory Staff and Health Care Providers | FDA, <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/genetic-variants-sars-cov-2-may-lead-false-negative-results-molecular-tests-detection-sars-cov-2>. (参照 2023-01-12)
19. 三崎 貴子, 岡部 信彦, 横田 啓, 長谷川 真成, 池田 宏宏, 福迫 俊弘, SARS-CoV-2 B.1.1.529 系統 (オミクロン株) による院内クラスター対策と事例解析における発症日と Ct 値および抗原定量値との関連—山口県—. *IASR.* 2022, 43, 1139-1141.
20. Paraskevi C. Fragkou, Charalampos D. Moschopoulos, Dimitra Dimopoulou, David S. Y. Ong, Konstantina Dimopoulou, Philipp P. Nelson, Valentijn A. Schweitzer, Hannah Janocha, Emmanouil Karofylakis, Konstantinos A. Papathanasiou, Sotirios Tsiordras, Giulia De Angelis, Clemens Thölken, Maurizio Sanguinetti, Ho-Ryun Chung, Chrysanthi Skevaki, European Society of Clinical Microbiology and Infection Study Group for Respiratory Viruses. Performance of point-of care molecular and antigen-based tests for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2022. doi:10.1016/j.cmi.2022.10.028.
21. Yoshitomo Morinaga, Hiroshi Yamada, Yoshihiro Yoshida, Hitoshi Kawasuji and Yoshihiro Yamamoto. Analytical sensitivity of six lateral flow antigen test kits for variant strains of SARS-CoV-2. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2023, 29, 2, 131-135.
22. Lori Bourassaa, Garrett A. Perchetti, Quynh Phung, Michelle J. Lin, Margaret G. Mills, Pavitra Roychoudhury, Kimberly G. Harmon, Jonathan C. Reed and Alexander L. Greninger. A SARS-CoV-2 Nucleocapsid Variant that Affects Antigen Test Performance. *Journal of Clinical Virology.* 2021, 141, 104900.
23. Dean Follmann, Holly E. Janes, Olive D. Buhule, Honghong Zhou, Bethany Girard, Kristen Marks, Karen Kotloff, Michaël Desjardins, Lawrence Corey, Kathleen M. Neuzil, Jacqueline M. Miller, Hana M. El Sahly and Lindsey R. Baden. Antinucleocapsid Antibodies After SARS-CoV-2 Infection in the Blinded Phase of the Randomized, Placebo-Controlled mRNA-1273 COVID-19 Vaccine Efficacy Clinical Trial. *Ann Intern Med.* 2022, 175, 9, 1258-1265.
24. Kei Miyakawa, Sousuke Kubo, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Hirofumi Go, Yutaro Yamaoka, Norihisa Ohtake, Hideaki Kato, Satoshi Ikeda, Takahiro Mihara, Ikuro Matsuba, Naoko Sanno, Masaaki Miyakawa, Masaharu Shinkai, Tomoyuki Miyazaki, Takashi Ogura, Shuichi Ito, Takeshi Kaneko, Kouji Yamamoto, Atsushi Goto and Akihito Ryo. Persistence of Robust Humoral Immune Response in Coronavirus Disease 2019 Convalescent Individuals Over 12 Months After Infection. *Open Forum Infect Dis.* 2022, 9, 2, ofab626.
25. Yutaro Yamaoka, Kei Miyakawa, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Rikako Funabashi, Koji Okudela, Sayaka Kikuchi, Junichi Katada, Atsuhiko Wada, Toshiki Takei, Mayuko Nishi, Kohei Shimizu, Hiroki Ozawa, Shuzo Usuku, Chiharu Kawakami, Nobuko Tanaka, Takeshi Morita, Hiroyuki Hayashi, Hideaki Mitsui, Keita Suzuki, Daisuke Aizawa, Yukihiro Yoshimura, Tomoyuki Miyazaki, Etsuko Yamazaki, Tadaki Suzuki, Hirokazu Kimura, Hideaki Shimizu, Nobuhiko Okabe, Hideki Hasegawa and Akihito Ryo. Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection tests. *Cell Rep Med.* 2021, 2, 6, 100311.

我が国における デング熱の現状と対策

Dengue Fever in Japan: Current Status and Countermeasures

貞升 健志
Kenji Sadamasu

東京都健康安全研究センター 微生物部 部長
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
Department of Microbiology (PhD, Manager, Department of Microbiology)

KEYWORD ▶

デングウイルス

蚊媒介感染症

遺伝子解析

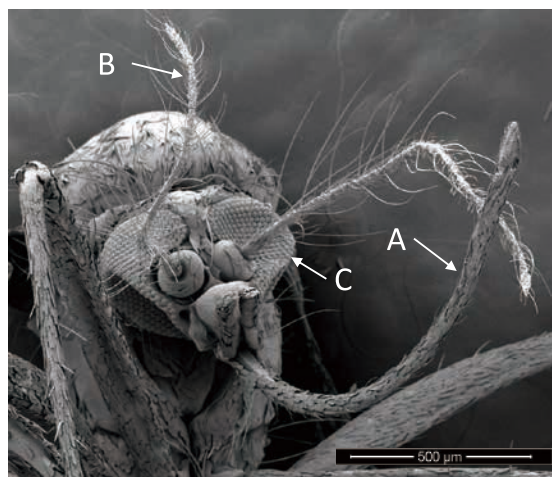
媒介蚊サーベイランス

はじめに

01

デング熱は感染症法の四類感染症、全数報告疾患であり、蚊が媒介する感染症の代表格である。他の蚊媒介感染症には、日本脳炎、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、黄熱病やマラリアが知られており、日本脳炎を除き、これらの疾患は海外で媒介蚊により病原体に感染し、帰国後感染が判明する輸入感染症である。一方で、これらの病原体を媒介可能な蚊が日本国内においても存在していることから、輸入感染症としてのみならず、国内での感染拡大防止にも留意しなければならない。我が国の蚊媒介感染症の発生数は、2019年末に発生した新型コロナウイルス (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 : SARS-CoV-2) による感染症 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) 下の行動制限 (渡航制限を含む) もあり減少したが、規制緩和に伴い、海外との行き来が増すことで、今後の患者数の増加が予想される。本稿では、我が国におけるデング熱の現状と対策について概説したい。

を吸血すると、蚊の中腸でデングウイルスは爆発的に増殖し、体液の流れに沿って唾液腺に多量のウイルスが集まる¹⁾。蚊がデングウイルスを摂取後、ヒトへの感染源となるまでの時間を外因性潜伏期間 (Extrinsic incubation period : EIP) というが、気温が25℃~28℃の場合のEIPは8日~12日間とされている。



A : 吻
B : 触覚
C : 複眼

図1 ヒトスジシマカの走査型電子顕微鏡画像
蚊は雌のみが吻(A)の中の刺針を通じて吸血する。

デング熱とは

02

1. デング熱と媒介蚊

デング熱は、フラビウイルス科フラビウイルス属のデングウイルスが原因の熱性疾患である。RNAウイルスであるデングウイルスは、血清学的・遺伝子構造的に異なる1型~4型の血清型に分類される。デングウイルスを媒介するのはシマ蚊亜属の蚊 (ネッタシマカ、ヒトスジシマカ) である。我が国においてネッタシマカは原則生息しないが、ヒトスジシマカ (ヤブカ類の代表格) 等のシマカ亜属 (図1) は広く生息している。後述の2014年に都内で発生したデング熱の集団感染事例では、デングウイルスを保有していたヒトスジシマカの媒介が原因となった。

ヒトスジシマカがデングウイルス感染者 (デング熱患者) の血液

2. デング熱罹患のメカニズムと臨床症状

デングウイルスを保有する蚊の場合、吸血時に蚊の唾液がヒトの皮下に注入され、その際にデングウイルスもヒトの体内に入る。3日~7日間の潜伏期の後、急激な発熱 (40℃) を呈する (発熱期) (図2)。発熱以外にも激しい頭痛、発疹、目の後ろの痛み、関節痛や筋肉痛、吐き気、嘔吐等の症状を伴うことがある。発熱期から臨界期にかけて、血小板や白血球数の減少、ヘマトクリット値の上昇等を起こす (図2)。一方で、症状の出ない不顕性感染の頻度は50%~80%と高い。ヒト-ヒト感染は母子感染 (妊婦が感染した場合) を除いて基本的でない¹⁾。デング熱を発症すると通常は1週間前後で回復するが、一部の患者は経過中に重度のデング出血熱の病態を呈することがある。臨界期に発熱や症状が

デング熱の検査と遺伝子解析

03

改善せず、警戒すべき徴候(激しい腹痛、持続的な嘔吐、腹水、胸水、粘膜出血、無気力、落ち着きのなさ等)を示す患者には注意する必要がある。デング熱患者が重症化する要因については、血清型の異なるデングウイルスによる二度目の感染に起因する説がある。

臨床で、鑑別診断が必要な疾患は、発疹を有するウイルス性疾患(麻疹、風しん、チクングニア熱、エンテロウイルス感染症)、チフス、マラリア、猩紅熱、A型肝炎、レプトスピラ症等とされ、海外渡航歴の有無は本疾患を絞り込む一つの要素となっている。

1. デング熱検査

デング熱検査は血液を検体とし、血清または血漿中のウイルス非構造タンパク質1 (Nonstructural protein 1 : NS1) 抗原や特異的IgM抗体の検出により行われる。それらを検出するイムノクロマト法による迅速検査試薬が体外診断用医薬品として承認・販売されている。感染後、血中のウイルス量は上昇し、それに伴い、NS1抗原が検出される。その後、血中ウイルス量(NS1抗原量)の減少に伴い、IgMが増加する。IgMは感染後約1週間で検出され、約3か月間検出可能である。IgGはIgMに遅れて上昇し、長く残存する。そのためIgGは既感染のマーカーとなる(図2)。

2. デングウイルスの遺伝子解析

デングウイルスは+鎖の10,000塩基~11,000塩基からなるRNAウイルスであり、遺伝子構造は(図3)に示す通りである。エ

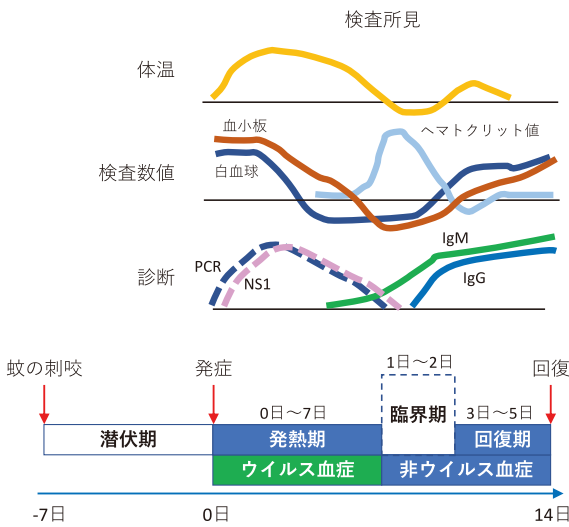


図2 デング熱発症前後の臨床的变化
蚊の刺咬の後、潜伏期、発熱期、回復期と推移していく。発熱期にはウイルス血症となり、NS1抗原やPCR等による診断が可能となる。発熱期後半からIgMが上昇し、その後IgGが産生される。
CDC, Dengue Clinical Case Management (DCCM) E-learning²⁾より引用改変

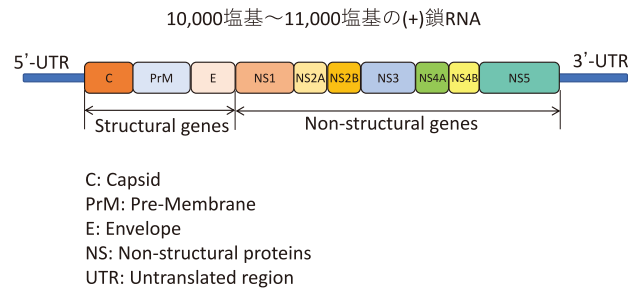


図3 デングウイルスの遺伝子構造
デングウイルスは10,000塩基~11,000塩基のRNAウイルスである。血清型や遺伝子型の判別はエンベロープ領域の遺伝子解析により行われる。

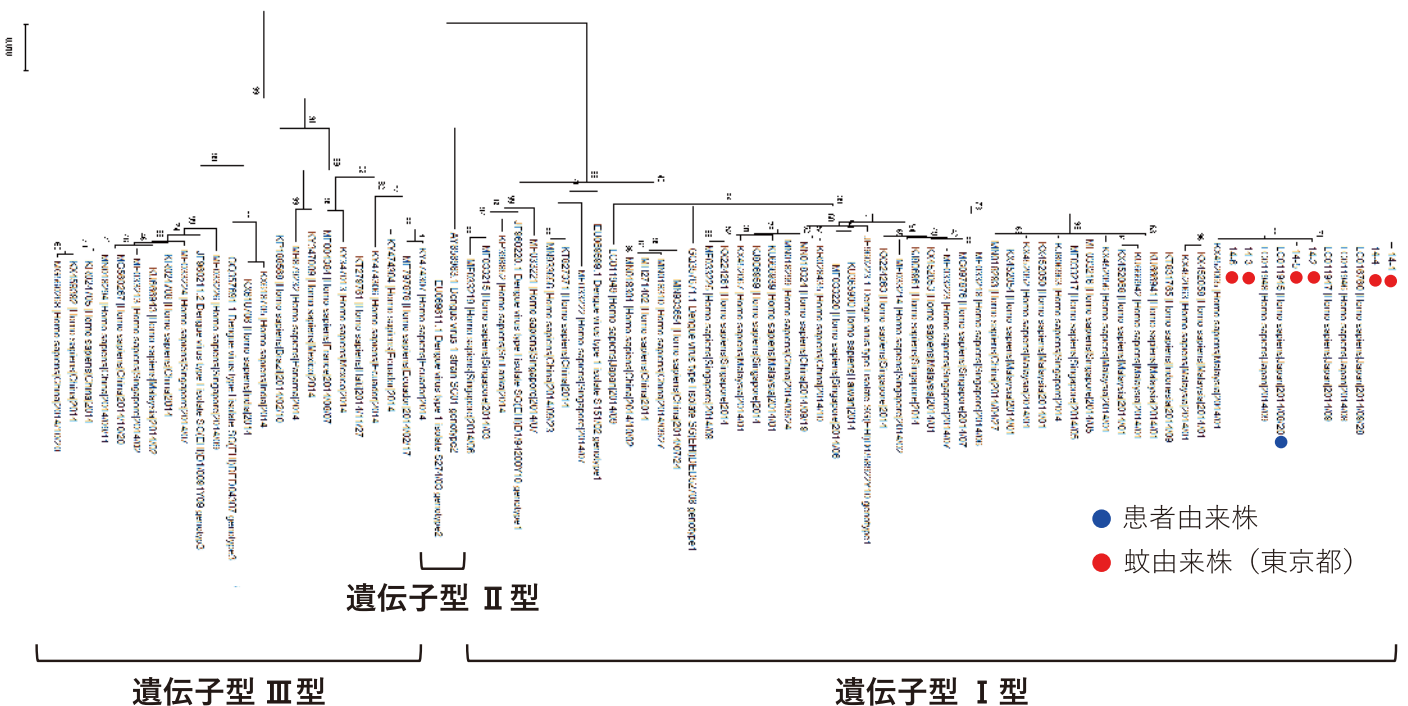


図4 2014年に世界で報告されたデングウイルス1型の分子系統樹解析
デングウイルス1型は遺伝子型I型~V型に分類されている。2014年にNational Center for Biotechnology Information (NCBI)に登録されたデングウイルス1型は遺伝子型I型が多くを占め、都内感染事例で患者および蚊から検出されたウイルスも遺伝子型I型であった。

ンベローブ領域の核酸増幅検査は、本症の確定診断とともに Dengue ウイルスの血清型の決定に使用される³⁾。特に、リアルタイム PCR では迅速な血清型別診断が可能であり、RT-PCR では検出後に塩基配列を解析することで、血清型のみならず詳細な遺伝子型の分類も可能となる(図4)。Dengue ウイルス1型~4型において、それぞれ5つ程度の遺伝子型に細分化され⁴⁾、2014年に遺伝子データバンクに登録された Dengue ウイルス1型の遺伝子型は主にI型とIII型であった⁵⁾。

Dengue 熱流行地では地域特異的な遺伝子型が流行することが多く、我が国の輸入感染症事例においても系統樹解析により感染地域の推定がある程度可能である。なお、発症後5日~6日(発熱期、解熱以前)以内の血液(血清または血漿)中にはウイルスが多く存在するため、この時期の検体が RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出・解析には適している。近年は、次世代シーケンサーにより、ウイルスの全長解析が可能である。患者検体から直接次

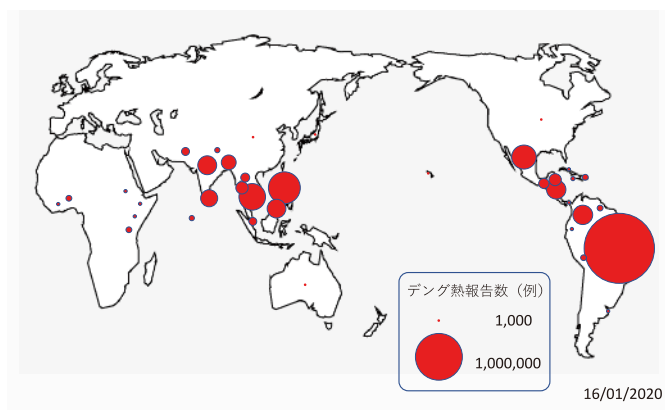


図5 世界における Dengue 熱の発生状況(2019年)
世界の熱帯・亜熱帯地域で Dengue 熱の報告数が多い。
European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC),
Geographical distribution of dengue cases reported worldwide, 2019⁷⁾
より引用改変

世代シーケンサーによる解析を行うためには、ウイルス量が多い検体(少なくともリアルタイム PCR で Ct 値 27 程度)である必要がある⁶⁾。Dengue ウイルスは Vero 系細胞で分離可能であるが、分離培養により増殖させた場合には、培養中にいくつかの遺伝子変異が入ることがある。

世界における Dengue 熱発生状況

04

Dengue 熱は世界の熱帯~亜熱帯地域で広く分布している(図5)。毎年1億人~4億人の感染者が発生していると推定されているが、多くは軽症もしくは無症状と考えられている¹⁾。European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) によると、世界で報告された Dengue 熱の症例数が最も多かったのは2019年で、アメリカ地域だけで310万人、アジアでは、バングラデシュ(10万人)、マレーシア(13万人)、フィリピン(42万人)、ベトナム(32万人)と報告されている(図5)。

我が国における蚊媒介感染症の発生状況

05

四類感染症、全数報告疾患である蚊媒介感染症の病原体と媒介蚊は表1に示す通りである。日本脳炎はコガタアカイエカと豚が関与し、我が国では古くから国内感染があるが、近年は散発的な発生に留まっている。多くの感染症の病原体を媒介するヒトスジシマカは我が国でも広く生息していることから、Dengue 熱のみならず、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、ウエストナイル熱の国内発生には常に注意する必要がある。また、マラリアを媒介するハマダラカも国内に生息するが、都内での捕獲数は比較的

表1 蚊媒介感染症(四類)の病原体と媒介蚊
表中の媒介蚊の中で我が国に生息していないのはネッタイシマカである。

感染症名	感染症法	病原体	発生地域	媒介蚊
Dengue 熱	四類	フラビウイルス科 フラビウイルス属 Dengue ウイルス	東南アジア、南アジア 中南米、カリブ海諸国	ヒトスジシマカ ネッタイシマカ等
チクングニア熱	四類	トガウイルス科 アルファウイルス属 チクングニアウイルス	アフリカ、南アジア 東南アジア	ヒトスジシマカ ネッタイシマカ等
ジカウイルス感染症	四類	フラビウイルス科 フラビウイルス属 ジカウイルス	中南米・カリブ海地域 オセアニア太平洋諸島 アフリカの一部、タイ	ヒトスジシマカ ネッタイシマカ等
日本脳炎	四類	フラビウイルス科 フラビウイルス属 日本脳炎ウイルス	日本、中国、東南アジア 南アジア	コガタアカイエカ
黄熱	四類	フラビウイルス科 フラビウイルス属 黄熱ウイルス	アフリカ、中南米	ネッタイシマカ等
ウエストナイル熱	四類	フラビウイルス科 フラビウイルス属 ウエストナイルウイルス	アフリカ、ヨーロッパ 中東、中央アジア 西アジア、米国等	アカイエカ、チカイエカ ヒトスジシマカ等
マラリア	四類	熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、 四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫	東南アジア、アフリカ 中南米	ハマダラカ

少ない傾向にある。

2011年～2022年の我が国における蚊媒介感染症の報告数を図6に示す。蚊媒介感染症の中でデング熱の発生数は著しく多い。また、世界における傾向と同様に、我が国におけるデング熱の発生も2019年が最も多かったが、2020年と2021年はCOVID-19による行動規制等により、蚊媒介感染症自体の報告数は著しく減少し、2022年には再び上昇に転じ始めている。デング熱との類症鑑別診断が必要なチクングニア熱は、2019年に49例の報告があったが、それ以外の年では10例前後の発生であり、ジカウイルス感染症についても数例程度で推移している。

163例(47.8%)と多く、過去最大であった。その理由は、2014年に都内の代々木公園において国内感染事例が発生したためである。2020年はCOVID-19の影響もあり全国の傾向と同様に13例と少なくなり、2021年の報告はなく、2022年は25例とやや増加した。

2. 推定感染地と季節性

東京都における2011年～2022年の輸入感染症としてのデング熱は、インドネシア、フィリピン、タイ、インド、ベトナム、マレーシア等が推定感染地として多く報告されている⁸⁾(図8)。これらの地域における過去の感染事例では、デングウイルス1型～4型全ての感染報告があり、全体では1型>2型>3型>4型の順で多かった。また、月別の報告数をみると、8月～10月に多い傾向はあるが(図9)、海外で感染の可能性ある地域では1年中デングウイルスに感染する機会があるとみるべきである。

東京都におけるデング熱 06

1. デング熱報告数

東京都と全国のデング熱報告数を図7に示す。東京都の報告数は、例年、全国の約25%程度を示している。2014年の報告数は

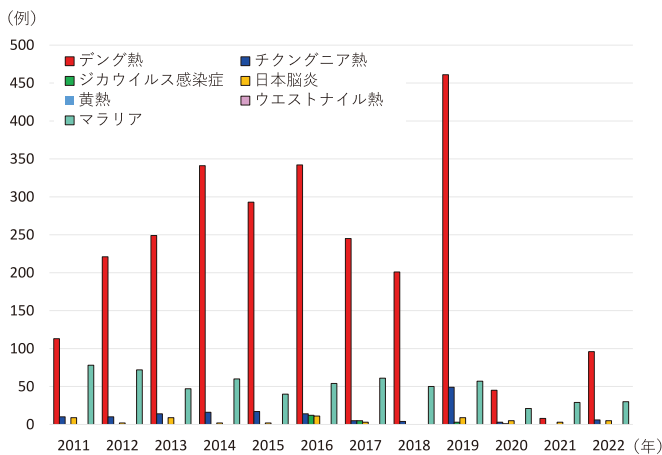


図6 我が国における蚊媒介感染症の報告数(2011年～2022年)

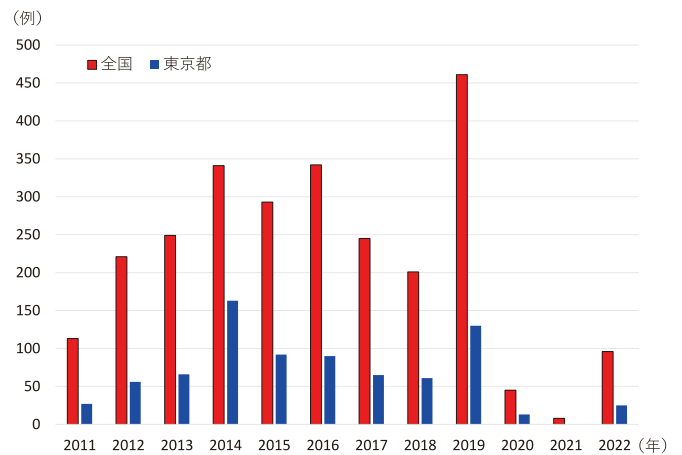


図7 全国と東京都におけるデング熱の報告数(2011年～2022年)

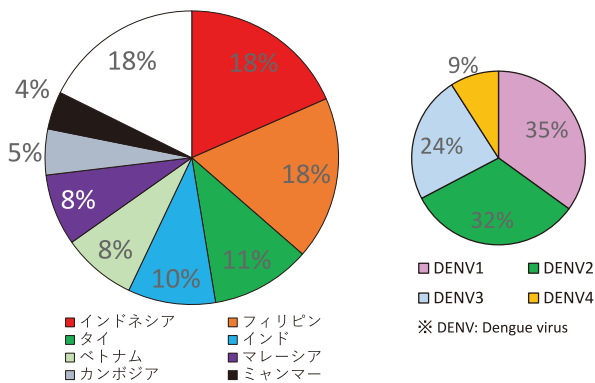


図8 デング熱の推定感染地と血清型(東京都、2011年～2022年)

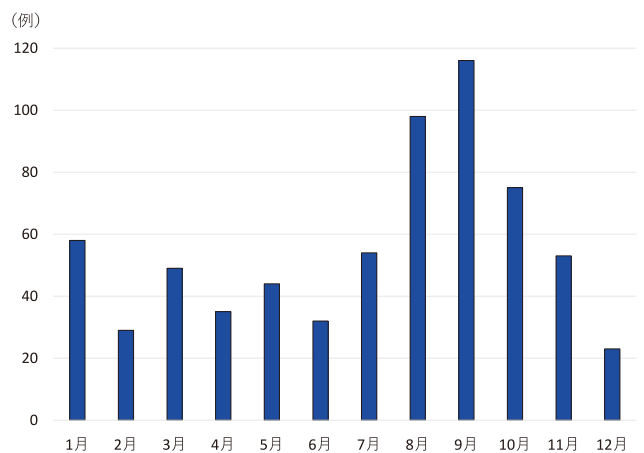


図9 デング熱の月別報告数(東京都、2011年～2022年)

デング熱国内感染事例

07

1. 過去の国内感染事例

戦前の1942年～1944年に広島、神戸、大阪等で大規模な国内感染事例が記録されている⁹⁾。それ以降にデング熱の国内発生は報告されておらず、輸入感染症としての報告のみであった。2013年8月にドイツ人旅行者が2週間、日本(東京、長野、京都、広島等)に滞在し、帰国後にデング熱を発症したことが2014年に海外誌で報告された(デングウイルス2型による感染)¹⁰⁾。個人的な見解ではあるが、この時点では国内感染の可能性について関係者は懐疑的な印象を持っていたと思う。

2. 東京都内のデング熱事例

1) 東京都内公園のデング熱事例

2014年8月に、東京都内の代々木公園が感染地と推定されるデング熱が発生した^{11, 12)}。東京都における国内感染事例は計108例(全国で160例)で、男性62.7%、女性37.3%、年齢中央値31.1歳(3歳～77歳)、推定感染日は8月3日から10月3日であった。事例の発端は、8月25日に、埼玉県在住で都内の学校に通学する10代の女性がデング熱陽性(デングウイルス1型)と診断されたことによる。本事例は感染者に海外渡航歴がなく、推定感染地が都内公園であった^{12, 13)}。そこで、8月26日から公園内に電池式ライトトラップを設置し(図10)、ヒトスジシマカを含むシマカ垂属の蚊を捕獲し、1チューブ30匹でまとめ、RNAを抽出後(図

11)核酸増幅検査によりデングウイルスの検出を試みた^{11, 12, 14)}。その結果、9月2日～3日、9月9日～10日、9月16日～17日に設置したトラップで捕獲したシマカ垂属からデングウイルス1型の遺伝子が検出された。デングウイルス1型陽性となった蚊が保有していたウイルス量は極めて多く、100万個～10億個/30匹チューブと推定された^{11, 14)}。さらに、塩基配列を比較した結果、国立感染症研究所により登録された患者由来株とほぼ同一であり、系統樹解析でも同様のクラスタ(デングウイルス1型、遺伝子型I型)に属した(図4)。なお、この時期に代々木公園を推定感染地とする都内デング熱患者由来のデングウイルスの塩基配列も全て同様であった。

この結果を受けて、公園の一部区域の閉鎖を行うとともに、区および近隣施設と協力して、薬剤散布(ピレスロイド系薬剤)や雨水枡への昆虫成長制御剤(Insect growth regulator : IGR)投与による蚊の駆除や蚊の生息調査・病原体保有調査等を継続的に実施した。その結果、デングウイルス1型を保有する蚊は検出されなくなり、翌年以降の媒介蚊サーベイランスでも一度も検出されていない。

2) 修学旅行の事例

2019年10月、東京都内において、海外渡航歴がないにもかかわらず、デング熱を発症した患者が2名確認された¹⁵⁾。患者は国内の修学旅行先(奈良市内または京都市内)でデングウイルスに感染したと推定されているが、感染地や媒介蚊等に関する詳細は解明されていない。



図10 蚊捕集用ライトトラップ
ドライアイス(→)を袋に入れ、一晩電球を点灯させる。引き寄せられた蚊は回転するプロペラによる風圧により白い捕集網に捕獲される。電池式で稼働する。



① 1.5 mLチューブにシマカ垂属を入れる(最大30匹/チューブ)。
② チューブに滅菌リン酸緩衝液(PBS) 300 μLを加える。



③ マイクロマルチミキサーを動かし、攪拌ペッセルで蚊の形が無くなるまで漬す(約1分間)。
④ チューブを遠心分離し、上清140 μLからRNAを抽出する。

図11 捕獲蚊からのRNA抽出

3) 国内発生事例からの教訓

2014年の国内感染事例では、埼玉県在住の患者の確定診断がまずあり、その後の的確な行政対応につながった。デング熱は輸入感染症のみと限定して考えてしまっていたら、診断には至らず、対応が遅れてしまったかもしれない。また、デングウイルスの血清型のみならず、エンベロープ領域の遺伝子配列の解析を行い、系統樹解析を行うことで感染経路の究明にもつながった。媒介蚊には極めて多くのウイルスが含まれるため、検査もその後の解析も可能であり、媒介蚊サーベイランスの有効性は高い。

なぜ、代々木公園の蚊が2014年にデングウイルス1型を保有するに至ったかは今なお不明であるが、海外でデングウイルス1型に感染した患者(おそらく不顕性感染)が公園を訪れ、その際に吸血したヒトスジシマカの中でウイルスが増殖し、さらに公園を訪れた別の人を吸血することで、感染が広がっていった可能性が高い。Tajimaらは、2014年に分離された複数のデングウイルスに対して次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行っている。その中で兵庫県の患者から分離された株は、代々木公園で分離された株とエンベロープ領域の配列は同一であったが、NS3およびNS4Aの配列の一部に変異があることを見出した。この変異はマレーシアで分離された株と相同性が高かったことから、2014年の国内感染事例はマレーシアからの別の輸入感染が発端となった可能性を推察している¹⁶⁾。

4) 都内デング熱事例以降の行政施策

2014年の国内感染事例を受けて、厚生労働省は2015年に蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針(2016年、2021年一部改正)を定めた¹⁷⁾。その中で、平常時からの予防対策として個

人レベルで蚊媒介感染症が国内に持ち込まれる頻度を低減させるように努めることとし、自治体に対しては媒介蚊サーベイランスの定点を定め、媒介蚊の発生状況の継続的な観測を行うこととした。東京都においても同年に東京都蚊媒介感染症対策行動計画を策定し、さらに予防指針を受け2016年に改訂している¹⁸⁾。その中では、国内感染を想定し、3段階(未発生時、発生時、アウトブレイク時)に分けた上で、詳細な行動計画を記述している。行動計画では、都が取り組むべき対策をはじめ、区市町村、保健所、医療機関、施設管理者等の関係機関、都民が取り組むべき対策を提示している。

デング熱の予防と媒介蚊サーベイランス

08

デング熱は輸入感染症であるため、海外旅行の際には蚊に刺されないための忌避剤等を使用した個人防御の準備・工夫が必要である。さらに、帰国後に各々が感染源とならないために、感染リスクに対する社会的な教育も重要といえる。

海外の蔓延地域においては、定期的な蚊の撲滅が必要となるが、我が国においては、地域的な感染症媒介蚊サーベイランスとデングウイルスの遺伝子サーベイランスが必要である。媒介蚊サーベイランスで陽性となった場合には、行動計画に則り公園等の閉鎖や消毒等を含めて迅速に対処していく必要がある。

媒介蚊サーベイランスとは、地域内の蚊の存在量(シマカ亜属やイエカ亜属の分類を含む)や捕獲蚊の病原体検査(デングウイルス等)を実施することにある。東京都においては、感染症媒介

表2 感染症媒介蚊サーベイランス(東京都)

	広域サーベイランス	重点サーベイランス
調査箇所	16施設(16箇所)	9施設(50箇所)
検査病原体	ウエストナイルウイルス デングウイルス チクングニアウイルス ジカウイルス マラリア原虫	デングウイルス チクングニアウイルス ジカウイルス
調査期間	6月~10月	4月~11月
年間調査回数	全10回	全14回
調査項目	・ウイルス保有蚊モニタリング(6月から10月まで)	・ウイルス保有蚊モニタリング(5月から10月まで) ・蚊の発生密度調査(4月と11月) ・蚊の幼虫発生調査(4月から11月まで、月1回)

蚊の早期探知を目的に感染症媒介蚊サーベイランスを2004年から広域サーベイランスとして、2015年からは重点サーベイランスとして継続的に実施している(表2)。それぞれ検査対象の病原体は少し異なるが、これらの結果を東京都健康安全研究センターのホームページ上で公開している¹⁹⁾。また、デング熱等の患者由来のウイルス遺伝子を継続的に蓄積し、データベースを作成することも、国内発生疑い時に備えて必要と思われる。

おわりに

09

最後にデング熱ワクチンについて少し触れておきたい。2015年にサノフィ社が販売した4価弱毒生ワクチン(Dengvaxia[®])は感染歴のある人に限定したワクチンであった。海外で新たに承認された武田薬品工業社の4価弱毒生デング熱ワクチン(QDENGGA[®])はこの制限がなく、2022年以降に諸外国で承認され始めている。デング熱撲滅に向け、新たにワクチンによる感染防御も積極的な政策の選択肢として提言されており、今後の活用にも大いに期待したい。

参考文献

1. WHO, Dengue and severe dengue, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (参照 2023-01-06)
2. CDC, Dengue Clinical Case Management (DCCM) E-learning, <https://www.cdc.gov/dengue/training/cme/ccm/index.html> (参照 2023-01-06)
3. 国立感染症研究所, 病原体検出マニュアル:デング熱 2014年9月版, <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf> (参照 2023-01-06)
4. 大阪大学, Dengue virus genotyping database, <http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/~uhmin/genotyping/index.html> (参照 2023-01-06)
5. NCBI, Dengue virus database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.cgi?taxid=12637> (参照 2023-01-06)
6. 齊木 大, 日向 綾子, 千葉 隆司, 久保田 寛顕, 鈴木 康規, 吉田 勲, 岡崎 輝江, 長谷川 道弥, 長島 真美, 根岸 あかね, 鈴木 愛, 栗田 さや子, 中山 愛子, 平井 昭彦, 秋場 哲哉, 新開 敬行, 黒田 誠, 貞升 健志. 国内感染事例より分離されたデングウイルスの次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析, 東京健安研七年報, 2017, 68, 55-59.
7. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Geographical distribution of dengue cases reported worldwide 2019, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-dengue-cases-reported-worldwide-2019> (参照 2023-01-06)
8. 感染症発生動向調査事業報告書 (2011年), (2012年), (2013年), (2014年), (2015年), (2016年), (2017年), (2018年), (2019年), (2020年), (2021年), 東京都福祉保健局.
9. 堀田 進, デング熱とデングウイルス, 日熱帯医学会誌, 2000, 28, 4, 369-381.
10. J. Schmidt-Chanasit, P. Emmerich, D. Tappe, S. Günther, S. Schmidt, D. Wolff, K. Hentschel, D. Sagebiel, I. Schöneberg, K. Stark and C. Frank. Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany, September 2013. Euro Surveill, 2014, 19, 3, 20681.
11. 貞升 健志, 東京都の蚊媒介感染症に対する総合的なサーベイランスの現状, 公衆衛生, 2018, 82, 1, 42-49.
12. 関 なおみ, 岩下 裕子, 本 涼子, 神谷 信行, 栗田 雅行, 田原 なるみ, 長谷川 道弥, 新開 敬行, 林志直, 貞升 健志, 甲斐 明美, 中島 由紀子, 渡瀬 博俊, 上田 隆, 前田 秀雄, 小林 一司, 石崎 泰江, 広松 恭子. 東京都におけるデング熱国内感染事例の発生について. 日公衛誌. 2015, 62, 5, 238-250.
13. 三浦 邦治, 川田 真幹, 柿本 年春, 渡辺 卓郎, 廣瀬 立夫, 小山 卓史, 高崎 智彦, モイ・メンリン, 中山 絵里, 田島 茂, 三浦 邦治. 三浦邦治, 川田真幹, 柿本年春, 他. 約70年ぶりに確認された国内感染デング熱の第1例に関する報告. IASR. 2015, 36, 3, 35-37.
14. 吉田 勲, 長島 真美, 千葉 隆司, 秋場 哲哉. 2014年に都内の公園が感染拡大の原因となったデング熱について. 小児科. 2016, 57, 395-400.
15. 厚生労働省健康局結核感染症課長, デング熱の国内感染事例の発生について. 健感発, 1016 第1号, 令和元年10月16日.
16. Shigeru Tajima, Eri Nakayama, Akira Kotaki, Meng Ling Moi, Makiko Ikeda, Kazumi Yagasaki, Yuka Saito, Ken-ichi Shibasaki, Masayuki Saijo, and Tomohiko Takasaki. Jpn. J. Infect. 2017, 70, 1, 45-49.
17. 厚生労働省, 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針, 平成27年厚生労働省告示第260号(一部改正平成28年厚生労働省告示第119号), <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000131650.pdf> (参照 2023-01-06)
18. 東京都, 東京都蚊媒介感染症対策行動計画, 平成28年5月改定, https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryo/kansen/dengue/index.files/Tokyo_mosquito_plan.pdf (参照 2023-01-06)
19. 東京都健康安全研究センター, 媒介蚊サーベイランス, https://www.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/kj_kankyo/mosq/mosquito/ (参照 2023-01-06)

2022年サル痘ウイルス感染症の世界的大規模流行の背景と対策

The mechanism of and control measures for the 2022 global outbreak of human monkeypox

西條 政幸
Masayuki Saijo

札幌市保健福祉局・保健所 医療政策担当部長
Sapporo City Health Office, Director of the Medical Affairs Department

KEYWORD ▶

サル痘ウイルス

痘瘡ワクチン

動物由来ウイルス感染症

LC16m8

Modified vaccinia virus-Ankara

Mpox virus

はじめに

01

ヒトサル痘 (human monkeypox:hMPX)という疾患は、ヒトにおけるサル痘ウイルス (Monkeypox virus:MPXV)による感染症のことである¹⁻³⁾。MPXVは痘瘡ウイルスと同様ポックスウイルス科オルソポックス属に分類される。痘瘡(天然痘)患者では水疱性・膿疱性皮膚病変が出現するが、hMPX患者においても同様の皮膚病変が出現する。これが、hMPXが痘瘡様感染症とされている所以である。しかし、ヒトからヒトへの感染機序、流行のあり方などの特徴は痘瘡のそれらと全く異なる。痘瘡ウイルスの宿主はヒトであるが、MPXVの宿主はアフリカ西部や中央部に生息する齧歯類と考えられている⁴⁾。

hMPXは1970年代にアフリカ(コンゴ民主共和国や西アフリカのいくつかの国々)で初めて確認された¹⁻³⁾。その後hMPX流行がコンゴ民主共和国で散発的に発生し、近年ナイジェリアでも増加している⁵⁾。1977年のエチオピアにおける痘瘡患者発生を最後に発生はなく、世界保健機関(World Health Organization: WHO)が1980年に痘瘡が根絶されたと宣言した。痘瘡ワクチン接種プログラムは国際的に中止され、痘瘡ワクチンを受けていない世代が増加している。それに呼応するかのようにアフリカ中央部や西部でhMPXの流行頻度や患者数が増加傾向にある。

過去、hMPX流行が非流行地で発生したことがある。それは2003年ペット用にガーナから米国に輸出された齧歯類が感染源となった流行である⁶⁾。その流行では疑い例を含めて70名超の患者が確認された。この米国の事例は非流行地における初めて流行であった。

2022年5月から欧州でhMPXが流行し始め、その流行は世界規模に広がり、患者数は半年で8万人を超えた。この世界規模のhMPX流行について、その特徴、流行の背景、流行対策のあり方について解説したい。hMPXの予防やその流行対策には痘瘡ワ

クチンが有効である。hMPXに対する抗ウイルス薬の開発やワクチンの開発状況についても解説を加えたい。

ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症

02

痘瘡と呼ばれるポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される痘瘡ウイルスによる全身感染症がある。潜伏期間はおおよそ12日(7日~16日)で、2日~4日間の発熱、全身倦怠感などの前駆症状に引き続き、発疹、水疱、膿疱、加齢の順に経過する皮膚症状が現れる(図1A)。水疱性・膿疱性皮膚病変が顔、四肢、体幹の順に出現するのが特徴のひとつで、軽いものから重症なものまで、病型はさまざまである。また、その致死率は約30%である。

1950年代にポリオに対する生ワクチンの製造に、カニクイザルの腎臓初代細胞が用いられていた。そのため多くの研究機関やワクチン製造機関ではアフリカミドリサルなどの霊長類が飼育されていた。デンマーク・コペンハーゲンの国立血清学研究所で飼育されていた霊長類が痘瘡様皮膚症状を呈し(図1C)、その個体から分離された病原体が、痘瘡ウイルスと同様にポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類されるウイルスであった⁷⁾。その病原体はMPXV、そのサルにおける疾患はサル痘 (Monkeypox:MPX)と命名された。

1970年にコンゴ民主共和国(旧ザイール)において、痘瘡ワクチン未接種の小児に痘瘡患者によく認められる皮膚症状に類似する症状を呈する痘瘡様患者が確認された(図1B)¹⁻³⁾。その患者から分離されたウイルスは痘瘡ウイルスではなく、MPXVであった。これが、hMPX罹患が確認された初めての患者である。西アフリカのいくつかの国々でも同様の事例が確認された²⁾。



図1 痘瘡(A)、ヒトサル痘(B)、サル痘(C)の皮膚病変
 痘瘡患者の皮膚病変(A)とヒトサル痘患者の皮膚病変(B)は、それぞれ倉田毅博士(元国立感染症研究所長)とJean-Jacques Muyembe Tamfum博士(Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, DRC)から提供を受けた。カニクイザルにおけるサル痘に関連する皮膚症状の写真(C)は、筆者が国立感染症研究所で行った感染実験時に得られたものである。

病原体

03

MPXという病名からはサル(霊長類)を宿主とするウイルスのように思われがちであるが、そうではなくその宿主は中央～西アフリカに分布するジリスなどの齧歯類である。

MPXVには、西アフリカ系統とコンゴ盆地系統の2種類の遺伝子型が存在する^{8, 9)}。コンゴ民主共和国やガボンで流行しているhMPXの原因ウイルスはコンゴ盆地系統MPXVであり、ナイジェリアやシエラレオネを含む西アフリカで発生しているhMPXの原因ウイルスは西アフリカ系統のMPXVである。コンゴ盆地系統MPXVの病原性は、西アフリカ系統MPXVのそれに比較すると高く、コンゴ民主共和国でのhMPXの致死率は約1.5%であったとする報告がある¹⁰⁾。一方、西アフリカ系統MPXVによるhMPX患者の症状は比較的軽く、致死率は相対的にとても低いとされている。筆者らによる霊長類(カニクイザル)を用いた、両系統のMPXVの病原性を比較する研究では、コンゴ盆地型系統MPXVの病原性、in vivoにおける増殖性は西アフリカ系統MPXVのそれらより高く、その違いは消化器系臓器などの内臓臓器でのウイルスの増殖性と病変の程度の違いによることが示唆されている⁹⁾。

疫学

04

1960年代にWHOが中心となって行われた、痘瘡ワクチン接種政策に基づいた痘瘡根絶活動の結果、1977年に確認されたソマリアでの最後の痘瘡患者をもって、1980年に痘瘡が根絶されたことがWHOにより宣言された。後述するが、痘瘡ワクチンはMPXV感染症にも有効である¹¹⁻¹³⁾。痘瘡の根絶により、痘瘡ワクチン接種プログラムが完全に中止された。それから日を経つにつれhMPX患者数が増加し、また、散発的流行発生頻度も高くなりつつある。

hMPX患者の発生地域はMPXVの宿主が生息する中央～西ア

フリカの熱帯雨林地域に限られていた。hMPX患者報告数がアフリカで、特にコンゴ民主共和国で増加し、2017年以降ではナイジェリアでも増加している。

hMPX流行がhMPX非流行地で発生したことがある。それは2003年5月から6月にかけての米国での流行である⁶⁾。西アフリカからペット用に輸入された齧歯類が感染源であったと考えられている。2003年4月、テキサス州のあるブリーダーがガーナのアクラ市から齧歯類(Gambian Giant ratやAfrican dormiceなど)を輸入し、この齧歯類から輸入業者が飼育していたプレーリードッグがMPXVに感染し、プレーリードッグのコロニーでMPXV感染症が蔓延した。そして、MPXVに感染したプレーリードッグがMPXV感染症を発症する前に、州をまたがる複数の動物ショップに搬送され、そこで呼吸器症状などを呈した個体に接触した人々が、MPXVに感染してhMPXを発症したのである。疑い例を含めて70名を超える患者が報告されている。この時の流行は西アフリカ系統MPXVによるものであった。この流行では死亡例はなく、ヒトからヒトへの感染事例の報告もなかった。これにより、hMPX非流行地での大きな流行が、MPXVを保有する動物の移動が原因で起こりえることが初めて確認された。

2022年に歴史上初めて世界的規模のhMPX流行が始まった。2022年5月に欧州の人々の間でhMPXが流行していることが確認され、欧州だけでなく、米国を含むアメリカ大陸諸国、世界各地域でhMPX患者が確認され始めた。米国Center for Disease Control (US CDC)の報告によると、2022年12月28日の時点で、世界全体で83,539人のhMPX患者が報告されている¹⁴⁾。米国だけで2万9000人超の患者が(図2)、欧州では2022年12月20日の時点で約2万6000人の患者が報告されている。多くの患者は欧州と米州諸国で発生している(図3)¹⁵⁾。

臨床症状

05

潜伏期間は7日～21日で、発熱、リンパ節腫脹、咽頭痛や咳嗽などの呼吸器症状、発疹が出現する。鑑別疾患としては水痘や性器

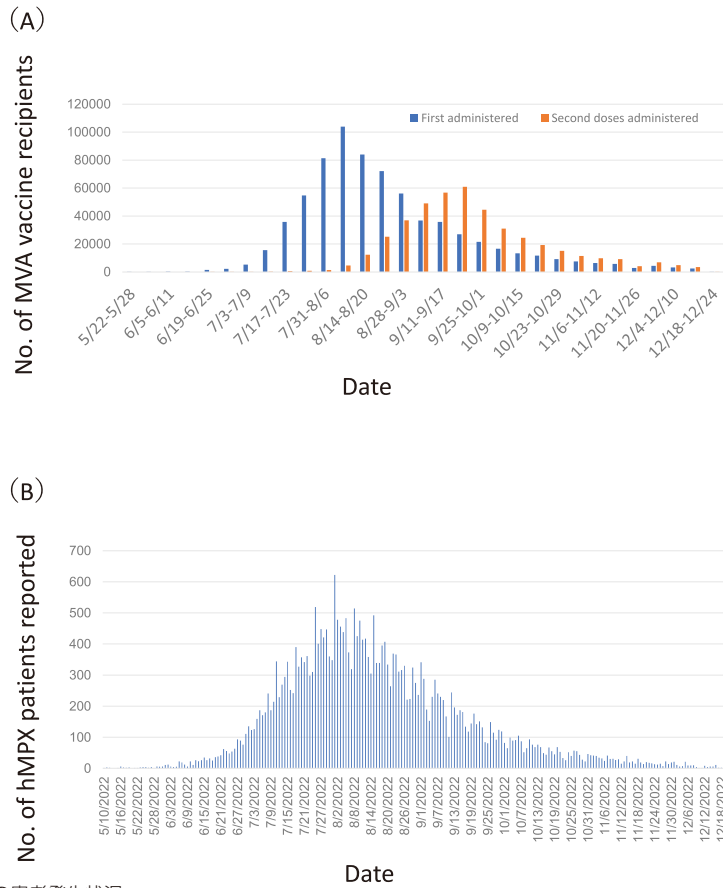


図2 米国での患者発生状況
 (A) 米国におけるMVAワクチン接種者数の推移²⁷⁾
 (B) 2022年hMPX患者の発生状況(日毎の新規患者報告数)²⁸⁾
 (A)および(B)の図は、米国CDCが発表した日毎のワクチン接種者数と患者報告数(週毎)に基づき、筆者が作成した。

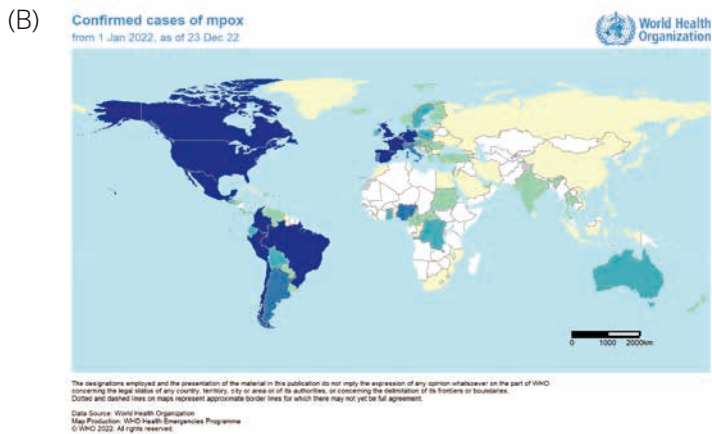
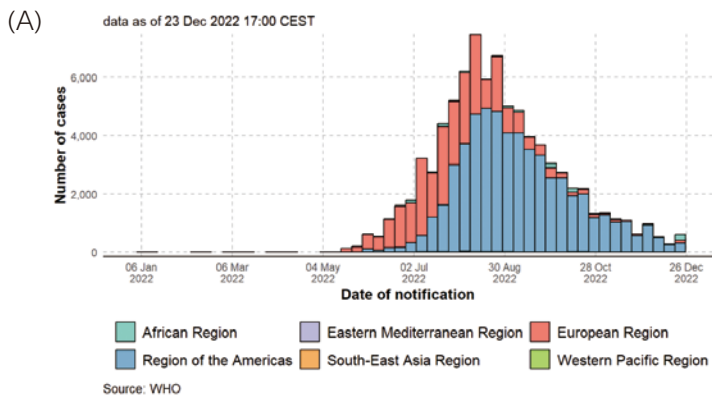


図3 全世界での患者発生状況²⁹⁾ (A) 週毎の患者報告数 (B) 各国における患者発生状況

ヘルペスなどの水疱性病変を呈する疾患が挙げられる。痘瘡は既に根絶されている疾患ではあるが、痘瘡も鑑別疾患に挙げられるべきであり、また、欧州で散発的に発生している牛痘ウイルス感染症も鑑別疾患として重要である¹⁶⁾。痘瘡患者にはあまり認められないリンパ節腫脹が約90%のhMPX患者に認められる。

通常、水疱・膿疱性病変は体の末梢領域から出現し、続いて中心部(体幹部)にかけて出現する。しかし、2022年5月からの大規模流行では、下記に説明するように、男性間の性的濃厚接触を通じた感染経路でMPXV感染が広がっていることもあり、生殖器や肛門周囲などの部位に病変が認められる患者が比較的多い。また、比較的病原性の低い西アフリカ系統MPXVによることから、膿疱性病変が数個認められるだけという軽症の患者も多いと報告されている¹⁷⁾。

あった。MPXVがMSMコミュニティの中に入り込み、そのコミュニティで広がったのである。これらの人々では、性的パートナーがMSMではない人々と比較して相対的に多いこと、性感染症と同じ機序でヒトからヒトにMPXVが伝播していることが、地理的にも、また、流行規模の上でも大規模な流行になった理由と考えられる。基本的にMPXVのヒトからヒトへの感染は、直接的接触感染以外にない。性的接触は、人と人との接触のあり方としては最も濃厚な接触のひとつと言える。そのような理由に加えて、今回のhMPX流行が西アフリカ系統MPXVだったことにより、症状が比較的軽いことから感染の事実が気がつかず性的接触を持つ機会が多かったことも理由のひとつと考えられる。これらの理由で2022年のhMPX流行が世界規模になったと考えられる。

診断

06

診断は皮膚病変や血液などの検体からMPXV(感染性MPXV、MPXV遺伝子、MPXV抗原)を検出することによる。具体的には、感染性のあるMPXVを細胞培養法で分離同定すること、MPXV遺伝子を定量的リアルタイムPCR法やコンベンショナルPCR法で検出することによる¹⁸⁾。また、急性期と回復期におけるMPXVに対する抗体価の有意な上昇を確認することで診断することもできる。ただし、MPXVに対する抗体は、中和抗体であってもワクチニアウイルス(痘瘡ワクチン)、牛痘ウイルス、痘瘡ウイルスなどのオルソポックスウイルスに交差反応を示すことから、血清学的診断は特徴的臨床症状と疫学的情報に基づく必要がある。

日本国内において、hMPXのウイルス学的検査は各都道府県や政令指定都市の衛生研究所で実施できる体制が整備されている。また、国立感染症研究所においても検査が実施できる体制が整備されている¹⁹⁾。検査が必要な場合には最寄りの保健所に相談するとよい。

2022年hMPXの世界的大規模流行の背景

07

2022年の世界的hMPX流行が発生するまでは、流行地で家族間や患者から医療提供者へのヒトからヒトへの感染事例が報告されていたものの、散発的な流行で収まっていた²⁰⁾。

例外は、上記の2003年4月から5月にかけて米国でマルチステートに、つまり、州をまたがって発生したhMPX流行である⁶⁾。それ以降、hMPX非流行地でhMPX流行が発生したことはなかったが、2022年5月より欧州から世界規模の流行が発生したのである。

2022年のhMPX流行が地域的・規模的に世界的かつ大規模な拡がりとなったのは、これまでに確認されたことのないヒトからヒトへの感染機序による。患者の95%以上が男性患者であり、患者のほとんどはMen who have sex with men (MSM)で

対策

08

1. 痘瘡ワクチン

hMPXVには痘瘡ワクチンが有効である¹¹⁻¹³⁾。痘瘡根絶活動や痘瘡予防のために1970年代まで用いられていた痘瘡ワクチンは、当該痘瘡ワクチン株のワクチニアウイルスを人工的に牛の皮膚で増殖させ、それをもとに製造されたいわゆる第I世代の痘瘡ワクチンである。第I世代痘瘡ワクチンは確かに痘瘡予防に有効である一方で、重篤な副反応を比較的高い頻度で引き起こすワクチンでもある。痘瘡が根絶されている今日では、第I世代痘瘡ワクチンを痘瘡流行に備えて備蓄することや実際にヒトに接種することは倫理的に難しい。

痘瘡に有効で、より安全な痘瘡ワクチン(第III世代痘瘡ワクチン)開発が継続されていた。現在、世界に第III世代の痘瘡ワクチンは2つ存在する。その一つがmodified vaccinia virus-Ankara (MVA)であり、もう一つがLC16m8である¹¹⁻¹³⁾。MVAとLC16m8は、それぞれ第I世代の痘瘡ワクチン株であるワクチニアウイルスAnkara株とLister株をもとに開発された。

MVAは、ワクチニアウイルス-Ankara株をニワトリの線維芽細胞で500回以上継代(細胞を新たに準備して増殖を繰り返すこと)して得られたウイルスである。MVAはニワトリ線維芽細胞では増殖性を示すが、他の細胞ではほとんど増殖性が認められない、いわゆる強い細胞選択性という特徴を有する痘瘡ワクチンである。ヒトにMVAを接種しても(感染させても)、MVA自体はほとんど増殖性を示さないことから副反応を誘発するリスクは低い。免疫誘導能も比較的低いことから、ワクチンの効果を十分に発揮させるためには2回の接種が必要とされている。一方、LC16m8は、故・橋爪壮博士により開発された痘瘡ワクチンである。痘瘡ワクチンLister株(ワクチニアウイルス)を30℃という増殖に不利な低温条件で、かつ、ウサギ腎臓初代細胞において増殖と選択(継代)を繰り返すことで得られたワクチンである²¹⁾。ウサギ腎臓由来細胞で高い増殖性を示し、さらに痘瘡ワクチンLister株が高い増殖性を示す高温条件(41℃)では増殖性を示さない。つまり、細胞選択性と温度感受性を示す痘瘡ワクチンである。日

本では痘瘡が根絶された現在においても、痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えてLC16m8が生産・備蓄されている。MVAもLC16m8も、開発された当時、既に痘瘡がほぼ根絶されていたことから、痘瘡に対する発症予防の有効性は評価されていなかった。カニクイザルなどの霊長類を用い、痘瘡ウイルスの代わりにMPXVを用いて、霊長類におけるMPXの発症予防効果が調べられている^{11, 13}。筆者らの研究では、LC16m8に霊長類におけるMPXの発症予防効果、接種3日以内の免疫誘導効果が認められることが確認されている²²。さらに曝露後接種であってもMPXの軽症化が示唆されている。欧米などではMVAが、日本ではLC16m8が、MPX対策のためのワクチンとして緊急認可されている。

hMPX流行をできるだけ小さくし、一人でも患者数を少なくするには、濃厚接触者がウイルスに曝露されたと考えられる時点からできるだけ早期にワクチン(MVAやLC16m8)接種を受けられるようにすること、リスクのある人々がこれらのワクチンをあらかじめ受けられるようにすることが必要である。実際に、米国や欧州ではMVAを希望すれば接種を受けることができるシステムが整備され、米国だけでも100万人以上の人々がMVAワクチン接種を少なくとも1度は受けている(図2A)。

hMPX患者数は米国や欧州において着実に減少している(図2B)。適切なワクチン接種政策と広報活動により、hMPX流行の排除(elimination)は可能と考えられる。ただし、MPXVは動物由来ウイルスであることから、これからもアフリカの一部では患者は発生し続けるため、根絶(eradication)は不可能である。

2. 抗ウイルス薬開発

米国では、痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロリズムに備えて痘瘡ウイルスに対する抗ウイルス薬の開発がなされてきた。Tecovirimat(ST-246)(SIGA Technologies)が痘瘡ウイルスを含むオルソポックスウイルスの増殖を抑制し、MPXVに対しても同様の効果が認められることが明らかにされている²³。Tecovirimatはウイルスタンパク質p37の活性を阻害する²⁴。p37はオルソポックスウイルスに共通して保存されている膜タンパク質である。オルソポックスウイルス粒子にはintracellular mature virion(IMV)、intracellular enveloped virion(IEV)、extracellular enveloped virion(EEV)の3つのステージがあり、p37膜タンパク質はEEV関連膜タンパク質のひとつである。EEVは病原性の発現に重要なステージのウイルス粒子であり、Tecovirimatはp37膜タンパク質の活性を阻害することにより抗ウイルス活性や治療効果を発揮する^{25, 26}。霊長類やプレーリードッグを用いたMPXV感染モデルでその有効性が報告されている。筆者らの霊長類を用いたMPXの病態に関する研究では、MPXVを霊長類に接種して発症する頃には既にウイルス血症レベルは高いレベルに到達している。Tecovirimatの治療効果を発揮させるには、発症後より早期に投与すること、濃厚接触者に対しては発症前からの投与も考慮されるべきである。

hMPX感染症においては、基本的にヒトからヒトへの伝播は接触感染経路による。ヒトからヒトへの感染はこれまでも報告されていたものの、家族間や患者と医療提供者の間でのことであった。今回の大規模流行は、西アフリカ系統のMPXVがMSMのコミュニティの人々の中に入り込んだことによる。しかし、hMPXの世界的大規模流行はMSMのコミュニティの方々だけの問題ではなく、MSMの方々を含む社会全体の問題として受け入れられるべき出来事である。MSMの方々がMPXVに感染するリスクが高いからといって、社会からリスクの高い人々として危険視されたり、社会から排除されたりすることはあってはならない。

コンゴ民主共和国や西アフリカではhMPXの散発的流行が発生し続けている。痘瘡ワクチン接種プログラムが中止されてから、日が経つ毎にその頻度が高まっている。コンゴ民主共和国での流行は、病原性が高いコンゴ盆地系統のMPXVによる流行であり、hMPXにより死亡している患者がいる。今、世界的にはMVAやLC16m8のようなhMPXに有効で安全なワクチンがある。これらのワクチンを用いたhMPX流行地でのワクチン接種プログラムを導入することが望ましい。そうすることにより、流行地でのhMPX流行の頻度が低減され、死亡する患者も減少する。それは輸入感染事例を源とした非流行地でのhMPX流行の発生リスクを低減させることにも繋がる。hMPX流行地で第Ⅲ世代痘瘡ワクチン接種が広く行われるようになることを期待している。また、非流行地においてもhMPX流行の状況を注視し、感染リスクが高いと考える方々が希望すれば、必要に応じて安全で有効な痘瘡ワクチンを受けられるような制度を整備することが期待される。

謝辞

本稿で発表した一部のデータは、国立感染症研究所ウイルス第一部、動物管理室、感染病理部のスタッフと共同で行った研究成果である。また、それらの研究の多くは、厚生労働省から研究費支援(厚生労働科学研究補助金)を受けてなされたものである。

追記

WHOは、2022年11月28日にMPX(サル痘)とMPXV(サル痘ウイルス)を、それぞれMpox(M痘)とMpox virus(M痘ウイルス)に変更することを発表した。しかし、本稿では病名とウイルス名については、従来のMPXとMPXVを用いた。

参考文献

1. I. D. Ladnyj, P. Ziegler, E. Kima, et al. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* 1972, 46, 5, 593-597.
2. B. Lourie, P. G. Bingham, K. L. Herrmann, et al. Human infection with monkeypox virus: laboratory investigation of six cases in West Africa. *Bull. World Health Organ.* 1972, 46, 5, 633-639.
3. S. S. Marennikova, E. M. Šeluhina, G. R. Macevič, et al. Isolation and properties of the causal agent of a new variola-like disease (monkeypox) in man. *Bull. World Health Organ.* 1972, 46, 5, 599-611.
4. L. Khodakevich, Z. Ježek, D. Messinger, et al. Monkeypox virus: ecology and public health significance. *Bull. World Health Organ.* 1988, 66, 6, 747-752.
5. D. Ogoina, M. Iroezindu. C. Ihekweazu, et al. Clinical Course and Outcome of Human Monkeypox in Nigeria. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, 8, e210-e214.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2003, 52, 27, 642-646.
7. P. von Magnus, E. K. Andersen, A. Birch-Andersen, et al. A Pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1959, 46, 2, 156-176
8. A. M. Likos, S. A. Sammons, I. K. Damon, et al. A tale of two clades: monkeypox viruses. *J. Gen. Virol.* 2005, 86, 10, 2661-2672.
9. M. Saijo, T. Mizutani, S. Morikawa, et al. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. *J. Gen. Virol.* 2009, 90, 9, 2266-2271.
10. B. M. Mandja, A. Brembilla, F. Mauny, et al. Temporal and spatial dynamics of monkeypox in Democratic Republic of Congo, 2000-2015. *Ecohealth.* 2019, 16, 476-487.
11. P. L. Earl, J. L. Americo, B. Moss, et al. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature.* 2004, 428, 182-185.
12. M. Saijo, T. Mizutani, S. Morikawa, et al. LC16m8, a Highly Attenuated Vaccinia Virus Vaccine Lacking Expression of the Membrane Protein B5R, Protects Monkeys from Monkeypox. *J. Virol.* 2006, 80, 11, 5179-5188.
13. I. Iizuka, Y. Ami, M. Saijo, et al. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017, 70, 4, 408-415.
14. CDC, 2022 Global Map & Case Count, <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html> (参照 2023-01-02)
15. ECDC, Mpox (formerly named monkeypox) situation update, <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/monkeypox-situation-update> (参照 2023-01-02)
16. A. Nitsche and G. Pauli. Sporadic human cases of cowpox in Germany. *Euro Surveill.* 2007, 12, 4, E070419.3.
17. R. Patrocinio-Jesus and F. Peruzzi. Monkeypox Genital Lesions. *N. Engl. J. Med.* 2022, 387, 1, 66.
18. M. Saijo, T. Mizutani, S. Morikawa, et al. Diagnosis and Assessment of Monkeypox Virus (MPXV) Infection by Quantitative PCR Assay: Differentiation of Congo Basin and West African MPXV Strains. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008, 61, 140-142.
19. 国立感染症研究所, 病原体検出マニュアル サル痘ウイルス (第2版 令和4年8月), <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/monkeypox20220805.pdf> (参照 2023-01-02)
20. L. D. Nolen, L. Osadebe, M. G. Reynolds, et al. Extended Human-to-Human Transmission during a Monkeypox Outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22, 6, 1014-1021.
21. M. Sugimoto, A. Yasuda, S. Hashizume, et al. Gene Structures of Low-Neurovirulent Vaccinia Virus LC16m0, LC16m8, and Their Lister Original (LO) Strains. *Microbiol. Immunol.* 1985, 29, 5, 421-428.
22. M. Saijo, Y. Ami, Y. Suzaki, et al. Post- and pre-exposure vaccination with a highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, and efficacy in protection of nonhuman primates from lethal monkeypox. in 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress, Elsevier, Vienna, Austria. 2010.
23. G. Yang, D. C. Pevear, R. Jordan, et al. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus Challenge. *J. Virol.* 2005, 79, 20, 13139-13149.
24. R. Jordan, J. M. Leeds, D. E. Hraby, et al. Development of ST-246® for Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses.* 2010, 2, 11, 2409-2435.
25. S. K. Smith, J. Self, I. K. Damon, et al. Effective Antiviral Treatment of Systemic Orthopoxvirus Disease: ST-246 Treatment of Prairie Dogs Infected with Monkeypox Virus. *J. Virol.* 2011, 85, 17, 9176-9187.
26. J. Huggins, A. Goff, D. Hraby, et al. Nonhuman Primates Are Protected from Smallpox Virus or Monkeypox Virus Challenges by the Antiviral Drug ST-246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 6, 2620-2625.
27. CDC, Vaccine Administration & Effectiveness, <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/vaccine-admin.html> (参照 2023-01-02)
28. CDC, 2022 U.S. Map & Case Count, <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/us-map.html> (参照 2023-01-02)
29. WHO, 2022-23 Mpox (Monkeypox) Outbreak:Global Trends, https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#section-fns2 (参照 2022-12-28)

ダニ媒介性脳炎治療法開発のための 核酸アナログによる ウイルス増殖抑制機序に関する研究

Mechanism of Inhibition of Multiplication
of Tick-Borne Encephalitis virus by Nucleoside Inhibitor

好井 健太郎
Kentaro Yoshii

長崎大学高度感染症研究センター研究部門ウイルス生態研究分野(教授)
National Research Center for the Control and Prevention of Infectious Diseases (CCPID),
Nagasaki University (Professor)

KEYWORD ▶ ダニ媒介性脳炎 核酸アナログ 人獣共通感染症 フラビウイルス

はじめに ～ダニ媒介性脳炎とは～

01

ダニ媒介性脳炎(Tick-borne encephalitis:TBE)はダニ媒介性脳炎ウイルス(Tick-borne encephalitis virus:TBEV)を原因とするウイルス性の人獣共通感染症で、感染した人に重篤な脳炎を起こす疾患である。ユーラシア大陸中北部では広くTBE患者が発生しており、マダニが媒介する重要な感染症の一つとして認知されているが、日本では殆ど知られていない感染症であった。最近になり、北海道では死亡症例を含むTBE患者が相次いで報告されている。また、調査研究によりTBEVは北海道のみならず日本に広く分布する可能性も示されており、その流行防止対策の重要性が指摘されている。本稿ではTBEについて、国内外における感染状況を概説し、その治療法開発に関わる最新の研究成果について紹介する。

ダニ媒介性脳炎の疫学

02

TBEVは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する人獣共通感染症の原因ウイルスである。フラビウイルス属には70種以上のウイルスが属しており、その中には人に病原性を示す多くの重要なウイルスを含んでいる¹⁾。フラビウイルス属のウイルスの多くは節足動物媒介性であり、その感染様式から、ダニ媒介性ウイルス、蚊媒介性ウイルス、ベクター不明のウイルス、脊椎動物への感染が報告されていない節足動物固有のウイルスの4つのグループに分かれている。蚊媒介性フラビウイルスには、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ジカウイルス等が挙げられる。近年、これらのフラビウイルスの流行地域の拡大が報告されており、世界人口の大部分が、一つ以上のフラビウイルスの流行地に居住している状況であり、世界的に公衆衛生上重要な問題となっている。

ダニ媒介性フラビウイルスは、哺乳動物または海鳥を脊椎動物

における主要な宿主とするウイルスに分類される。海鳥を宿主とするダニ媒介性フラビウイルスは人に病原性を示すという報告はないが、哺乳動物を宿主とするウイルスには、TBEVの他にもキャサヌール森林熱ウイルス(Kyasanur forest disease virus:KFDV)、オムスク出血熱ウイルス(Omsk hemorrhagic fever virus:OHFV)、ポワソンウイルス、跳躍病ウイルス等、人に病原性を示すウイルスが含まれている。これらのダニ媒介性フラビウイルスは「TBEV血清型群」と呼ばれる血清型グループを構成しており、抗原性が非常に似通っているため、特異性が高いとされる中和試験による特異的抗体検出法においてもウイルス間の交差反応性が認められる²⁾。

ダニ媒介性フラビウイルスは遺伝学的にも血清学的にも非常に近縁にあるにも関わらず、KFDVやOHFVのように出血熱様症状を引き起こすものと、TBEVに代表されるように脳炎による神経症状を引き起こすウイルスが存在する。しかし、このような症状の違いを引き起こすウイルスの遺伝子要因等の情報は乏しい。

TBEVは自然界ではマダニによって媒介されており、主にIxodes属のマダニが主要な媒介マダニであるとされているが、他にもDermacentor属、Haemaphysalis属等の幅広い種のマダニからウイルスが検出されており、TBEVの感染環に関与している事が示唆されている。TBEVはマダニの中で、脱皮を経ても感染が維持されること(経齢間伝達)ならびに卵を通じて次世代にTBEVが伝達する事(経卵巣伝達)が知られており、即ちマダニの中で世代を超えて長期間ウイルスが維持されることが可能である。

自然界において、TBEVはウイルスを保有するマダニの吸血を介して、小型野生げっ歯類を中心に様々な野生動物との間で感染環が維持されているが、犬等の伴侶動物や羊や山羊等、幅広い哺乳動物種に感染する事が報告されている。ヒトへの感染は主にマダニの吸血によるが、山羊等のTBEVに感染した家畜動物の生乳やそれに由来する乳製品の飲食を介した人への感染もヨーロッパで報告されている³⁾。

TBEはユーラシア大陸の広域で、年間一万人前後の患者が発生

して、患者報告地域も拡大している。TBEVは遺伝子性状から、ヨーロッパ型、シベリア型、極東型の3つの主要なサブタイプに分類される。各サブタイプの地理的分布については、重複する地域もあり、韓国でヨーロッパ型が分離される等、ユーラシア大陸内でTBEVが頻繁に移動していることが示唆されている。

日本においては、1990年代の前半までTBEVは存在しないと考えられてきた。しかし1948年に発生した日本脳炎流行時に、脳炎疑い患者からTBEV血清型群ウイルスの一つである跳躍病ウイルスが分離されており、感染者が本州において発生していた事が明らかになっている⁴⁾。そして1993年に北海道南部において、国内初のTBE確定診断症例が発生し⁵⁾、2016~2018年には4例の症例が北海道各地で報告されており、内2名は死亡している^{6,7)}。

我々は国内初のTBE確定診断症例の発覚以来、継続的に動物を対象とした血清疫学調査を行ってきているが、北海道の広範な地域および西日本において、抗TBEV抗体を保有する動物が生息している事を明らかにしており、日本の広域にTBEVの流行巣が存在している可能性を示してきている⁸⁾。また、過去のTBEV感染者についての遡及調査を行い、神経疾患を呈した患者の中にTBEV患者がいたこと、マダニに吸血される機会の多い職業への就業者の中にTBEV感染歴のある人がいた事等、見逃されてきたTBEV感染を明らかにしている^{9,10)}。

痛、発熱、関節痛や筋肉痛等のいわゆるインフルエンザ様の症状が見られる。この第1期の症状はヨーロッパ型TBEVの感染ではよく見られるが、シベリア型および極東型TBEVでは殆ど症状が認められないまま第2期に進む事が多い。第1期は数日程続き、中枢神経系に侵入した場合は第2期に進み重症化する。この場合、髄膜炎により精神錯乱・昏睡・痙攣及び麻痺等の中枢神経症状が認められる。致死率はヨーロッパ型TBEVでは1%~2%程度と報告されているが、極東型TBEVの場合、致死率は数十%にも上るとの報告がある。また第2期から回復した場合においても40%~60%の患者で知覚障害、運動障害等の後遺症が残る。

TBEの予防のためのワクチンは海外で数社から製造されている。中でもPfizer社やGSK社から製造されているワクチンは信頼性が高く、疫学的にもワクチン接種により患者数が減少することがオーストリアでの研究等において示されている¹²⁾。これらのワクチンは日本に分布しているTBEVにも防御効果があることが、ワクチン接種者血清の日本分離TBEV株に対する中和試験や、マウスモデルを用いた感染防御試験により報告されている¹³⁾。しかしこれらのワクチンは日本では未承認であり、一部のトラベルクリニック等において保険適用外で接種可能である。

また、ウイルス特異的な治療法はなく、過去にTBE特異的な免疫グロブリン製剤が有効として使われてきたが、近年の研究では副作用の懸念から推奨はされていない。従って、TBE患者への対応には対症療法が中心となるため、抗TBEV作用を示す特異的な治療薬の探索ならびに開発が強く望まれている。

核酸アナログによる ダニ媒介性脳炎ウイルスの増殖抑制

03

1. TBEV感染による臨床症状と予防・治療の現状

フラビウイルス属のウイルス遺伝子は+鎖、一本鎖のRNAであり、約11,000塩基で構成される。ウイルス遺伝子RNAは1つのopen reading frameをコードしており、ここから約3,400アミノ酸の一つのタンパク質として翻訳された後、宿主又はウイルスのプロテアーゼにより3つの構造タンパク(C, prM, E)と7つの非構造タンパク(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)へと切断される¹¹⁾。NSタンパク質は複製複合体と呼ばれる構造を形成し、主にウイルスゲノムRNAの複製に関与しており、NS5はRNA依存性RNAポリメラーゼ(RNA-dependent RNA polymerase: RdRp)とメチルトランスフェラーゼとしてゲノム複製における重要な機能を果たしている。

TBEVに感染すると、局所リンパ節でウイルスは初期増殖する。その後、ウイルス血症を起こして各組織へ伝播し、血液脳関門を直接通過もしくはその機能を破綻させることで脳内へ侵入すると考えられている。しかし、ウイルス増殖に最適な組織や、血液脳関門を突破するメカニズム等のウイルスの体内動態については不明な点が多い。

ヒトがTBEVを保有するダニに吸血された場合の発症率は5%~30%と報告されており、通常7日間~14日間の潜伏期を経て発症する。症状はウイルス血症が起こっている第1期とウイルスが中枢神経系に侵入した後の第2期に分かれる。第1期では頭

2. TBEVの増殖を抑制する核酸アナログ

ウイルス特異的な治療薬を開発するためには、どのウイルスタンパク質を標的として、ウイルスの増殖過程のどの段階に作用させるかを検討する必要がある。その中で、ウイルスゲノムの複製過程を標的とした薬剤の開発が進んできた¹⁴⁾。特に、ウイルス由来のDNA/RNAポリメラーゼは、ウイルス特異的かつ複製過程に直接的に作用する酵素であり、抗ウイルス剤の標的タンパク質として注目されている。フラビウイルスのゲノム複製においてもウイルス由来のNS5がRdRpとして重要な機能を果たすことが明らかになっているため、NS5のRdRp機能を阻害する化合物の探索が広く行われてきた¹⁵⁾。

核酸アナログは、DNAやRNAの構成単位であるヌクレオシドと構造が類似した化合物で、ヌクレオシドに代わってウイルス由来DNA/RNAポリメラーゼに取り込まれることにより、ウイルスゲノムの合成阻害効果を示すことが知られている¹⁶⁾。代表的な核酸アナログの治療薬としては、抗ヘルペスウイルス薬としてアシクロビルやガンシクロビル、抗B型肝炎ウイルス薬であるラミブジンやエンテカビル等が知られている¹⁷⁾。フラビウイルス科のC型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus: HCV)に対しても核酸アナログであるソフィブシリンが治療薬として使用されている。

3. 7-D'-2'-CMAによるTBEVの耐性変異

私達の研究グループは、TBEVに対して抗ウイルス効果を示す核酸アナログの検証を試みてきた。この中で他のフラビウイル

スにおいても効果を示していた核酸アナログの内、7-deaza-2'-C-methyladenosin (7-D-2'-CMA:図1)が、培養細胞においてTBEVに対しても抗ウイルス効果を示すことを明らかにしてきた¹⁸⁾。さらに、TBEVを7-D-2'-CMA存在下で継代培養を繰り返すことにより、7-D-2'-CMA存在下においても増殖可能な耐性ウイルスが回収された。回収されたウイルスをシークエンス解析した結果、NS5の603番目のセリンがスレオニンに置換されていた(S603T)。

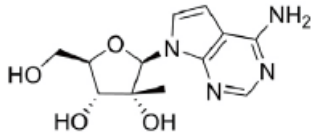


図1 7-deaza-2'-C-methyladenosine (7-D-2'-CMA)

そこで、S603T変異を持つTBEVの性状を解析するために、ウイルスに任意の変異を導入できる極東型TBEV Oshima5-10株の感染性cDNAクローンを使用して、NS5領域にS603T変異を導入したクローンウイルス(Oshima-IC S603T)を作製した。作製したクローンウイルスについて、BHK細胞に接種して形成されるウイルス感染細胞のフォーカスのサイズを検討した所、野生型(WT)接種細胞では、感染後36時間でフォーカスが検出されたのに対し、Oshima-IC S603T接種細胞では、感染後36時間ではフォーカスが検出されなかった。感染後72時間でフォーカスが検出されたものの、そのフォーカスサイズはWTのものと比較して小さかった(図2)。これにより、S603Tの変異はTBEVの増殖性を低下させることが示唆された。

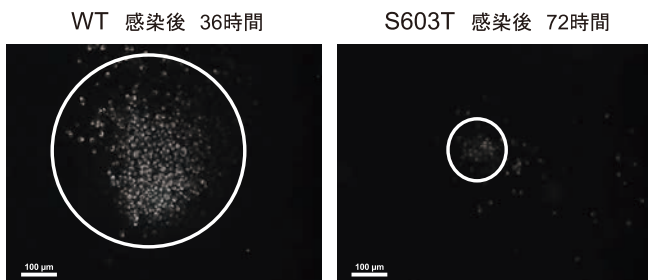


図2 WTとS603Tのフォーカス形状の比較
BHK細胞へ、TBEV Oshima-IC WT、Oshima-IC S603Tを感染させ、培養後に固定し、間接蛍光抗体法によってフォーカスを検出した。フォーカスが形成された箇所を丸で示した。

導入したS603T変異の野生型配列への復帰性を評価するために、Oshima-IC S603T mRNAをBHK細胞に遺伝子導入し、7-D-2'-CMA存在下において培養し、細胞内で増殖したウイルスゲノムの変異導入領域の塩基配列を解析した。25 μmol/L以上の7-D-2'-CMA存在下でOshima-IC S603T mRNA遺伝子導入細胞を培養した場合、S603Tをコードする配列(9471-9473番目の塩基)に変化は認められなかった(図3)。しかし、12.5 μmol/Lの7-D-2'-CMA存在下で培養した場合、9471番

目の塩基はAとTの二重波形を示しており、603番目のアミノ酸がスレオニンとセリンのウイルスが混在していた。さらに低濃度での培養を行った場合、9471番目の塩基はTの単一の波形を示した。以上の結果から、低濃度の7-D-2'-CMA存在下では、野生型配列(セリン)への復帰変異体が出現することが示された。

WT	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 50μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	A	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 25μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	A	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 12.5μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 6.25μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490
S603T 0μM	nt 9460	ACCAAAGAGGT	T	CAGGACAGGTTGTGACCTA	nt 9490

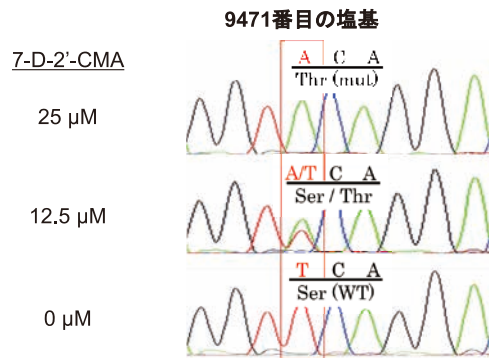


図3 S603T変異の安定性
BHK細胞にOshima-S603TのmRNAを遺伝子導入し、7-D-2'-CMA存在下で培養後、細胞を回収し変異を導入した領域の塩基配列を解析した。

ウイルスのゲノム複製過程における、7-D-2'-CMAの薬剤耐性変異の影響を解析するために、ウイルス遺伝子から構造タンパク領域を欠損させ、非構造タンパクの機能によりゲノムの自己複製機能のみを保持したレプリコンを用いた解析を行った。レポーター遺伝子としてレプリコンにLuciferase遺伝子を挿入し、レプリコンの複製をLuciferase活性の測定により調べた。レプリコンを遺伝子導入した細胞では、WTと比較してS603TはLuciferase活性が低下しており、クローンウイルス感染細胞と同様に、S603T変異によりウイルスのゲノム複製能力は低下することが示された(図4)。

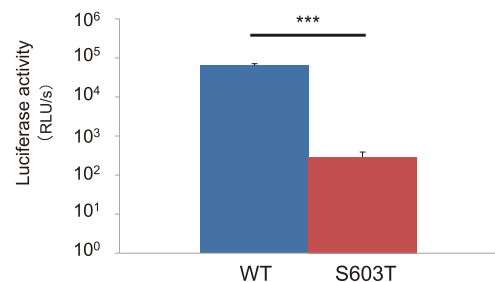


図4 Luciferase発現レプリコン導入細胞のLuciferase活性
BHK細胞にOshima-rep-luc2AのmRNAをトランスフェクションし、培養後、細胞内のLuciferase活性を測定した。
*** p<0.001

さらにWTのレプリコン導入細胞では7-D-2'-CMAの濃度依存的にLuciferase活性の低下が認められたのに対し、S603T導入細胞では7-D-2'-CMAの存在下においてもLuciferase活性の有意な変化は認められず、S603T変異により、7-D-2'-CMAに対する感受性が低下し、薬剤耐性を獲得していることが示された(図5)。

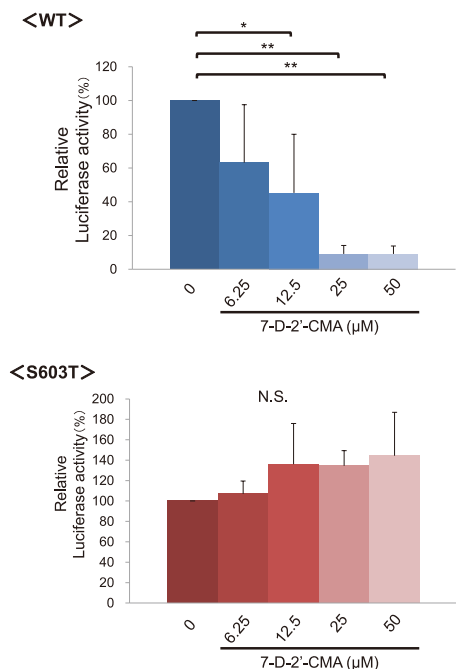


図5 7-D-2'-CMA存在下におけるレプリコン導入細胞のLuciferase活性 BHK細胞にOshima-rep-luc2A WTもしくはS603TのmRNAをトランスフェクションし、7-D-2'-CMA存在下で培養後、細胞内のLuciferase活性を測定した。
* p<0.05, ** p<0.01, N.S. 有意差無し。

続いて各種核酸アナログ誘導体のTBEVゲノム複製阻害効果の評価を行ったところ、WTでは7-D-2'-CMA、2'-C-methylguanosine (2'-CMG)、および2'-C-methylcytidine (2'-CMC)によりLuciferase活性の低下が認められたのに対し、S603T導入細胞では、2'-CMCを作用させた細胞のみでLuciferase活性の低下が認められた(図6)。

マウスモデルにおけるS603Tの変異の病原性への影響を解析するために、ウイルスを6週齢のC57BL/6マウスにそれぞれ50 PFU (Plaque-Forming Unit) ずつ脳内接種し症状を観察した。WTとS603Tともにウイルス接種後の発症率と生存率に有意差は認められなかったが、WT接種マウスでは平均生存期間は9.33日であったのに対し、S603T接種群では14.75日と有意に延長しており、S603T変異により感染マウスにおける病原性が低下したことが示された。さらに、S603T接種マウスにおけるウイルスの復帰変異体の出現の検討を行ったところ、10検体中9検体で、導入したS603Tのアミノ酸変異が維持されていたが、新たにNS5のQ620L、C666Sのアミノ酸変異が観察された。この2カ所のアミノ酸変異のウイルス増殖への影響を解析するために、マウスから回収したウイルスのフォーカス形成を検証

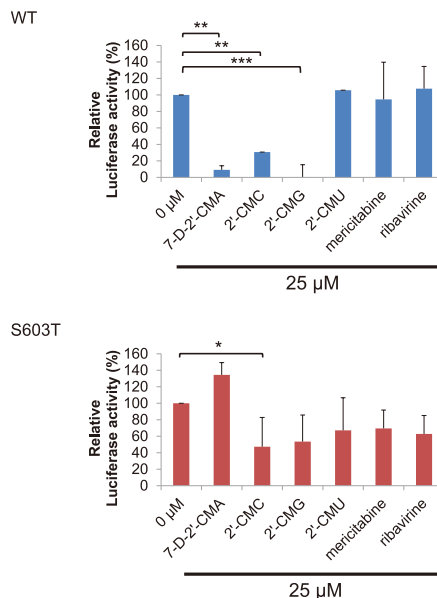


図6 各核酸アナログ存在下におけるレプリコン導入細胞のLuciferase活性 BHK細胞にOshima-rep-luc2A WTもしくはS603TのmRNAをトランスフェクションし、各核酸アナログ存在下で培養後、細胞内のLuciferase活性を測定した。* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001。

したところ、S603T感染細胞よりも大きなフォーカスが認められ(図7)、マウスの脳内で生じたQ620LとC666Sの2つの変異はS603Tにより減少したウイルスの増殖性を代償的に高める変異である可能性が示唆された。

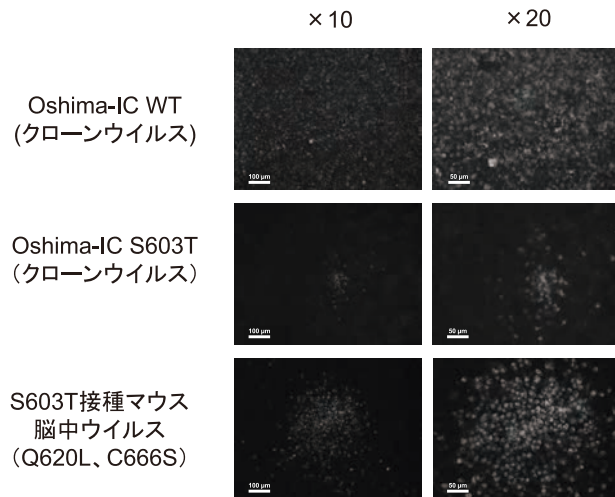


図7 S603T接種群マウス脳乳剤のFocus形状の比較 Oshima-IC S603T接種マウス脳から回収したウイルスをBHK細胞へ感染させ、フォーカスを検出し、比較した。

終わりに

04

TBEVのNS5のRdRp領域のホモロジーモデリングにより構築した立体構造の解析によると、S603T変異はRdRp領域中のFingers、Palm、Thumbという3つのサブドメインの中のFingerサブドメイン内に存在し、ゲノムの複製の際にヌクレオ

シドが取り込まれる中心部に近接している(図8)。HCVでは、NS5Bの酵素活性部位近傍に位置する282番目のセリンがスレオニンに変異(S282T)することで、核酸アナログである2'-C-methyladenosineに対する耐性を獲得することが報告されており¹⁹⁾、TBEV NS5のS603T変異はこのS282T変異と立体構造上同様な位置に存在している。以上のことから、TBEVの7-D-2'-CMAに対する薬剤耐性獲得のメカニズムは、S603T変異によってRdRp酵素活性部位近傍の構造に変化が生じ、薬剤との結合性に変化が生じることによるものと考えられる。

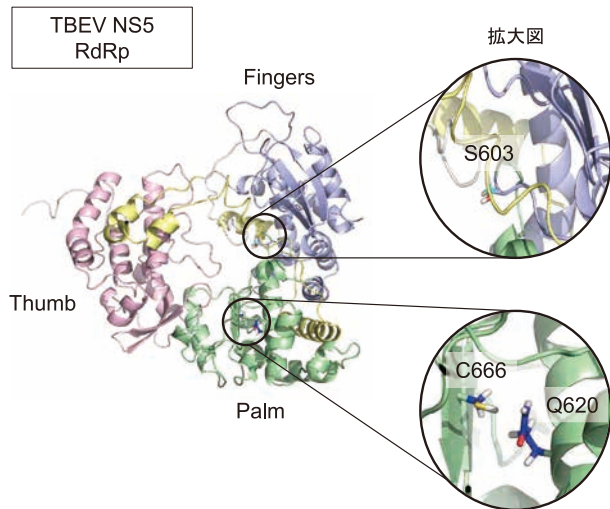


図8 デングウイルスのRdRp立体構造(PDB code 2J7W)を基にホモロジーモデリングにより作製したTBEVのNS5 RdRp蛋白質立体構造における7-D-2'-CMA耐性変異部位(S603)とS603T接種マウスで生じた変異部位(C666、Q620)

S603T変異によって7-D-2'-CMAに対する薬剤耐性を獲得する一方で、ウイルス本来の増殖性が低下することも我々の実験によって示された。過去の研究でも、核酸アナログによりRdRpの酵素活性部位近傍の変異が生じたウイルスで増殖性が著しく低下することがHCVで報告されている²⁰⁾。このウイルスの増殖性の変化についても、S603T変異によってRdRp酵素活性部位近傍の立体構造が変化したことで、RdRp活性中心とウイルスゲノムRNAの結合性の変化や、PalmドメインでのウイルスゲノムRNA伸長反応の酵素活性が低下したと考えられる。

S603T接種マウス脳内では、復帰変異は殆ど認められず、代わりにQ620LとC666Sという2つの新たなアミノ酸変異が認められた。この2つのアミノ酸はいずれもPalmドメインに位置し、両残基の側鎖が向き合って相互作用していると予想された。マウスの脳内では、S603T変異による増殖性の低下を補うQ620LとC666S変異が代償的に生じ、脳内におけるウイルスの増殖性も向上したため、S603T変異の野生型配列への復帰変異が生じなくなると考えられる。

培養細胞系における復帰変異体の出現確率から、生体組織中で復帰変異が起こる可能性は否定できないが、我々の研究グループによる別の実験により、7-D-2'-CMAをヨーロッパ型TBEV接

種マウスに投与した場合に明らかな症状の軽減と生存率の回復が認められている。したがって、薬剤の適切な投与計画の検討を行うことによって、重症化の回避に繋がると考えられる。以上のことから、7-D-2'-CMAは感染早期段階での抗TBEV候補化合物として十分に有用な化合物であると考えられ、今後さらなる検討を重ねることによって、臨床現場への応用が期待される。

参考文献

1. E. A. Gould and T. Solomon, Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008, 371, 9611, 500-509.
2. H. Holzmann et al., Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.* 1996, 48, 102-107.
3. P. Bogovic and F. Strle, Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases.* 2015, 3, 5, 430-441.
4. K. Ando et al., Studies on the viruses isolated during epidemic of Japanese B encephalitis in 1948 in Tokyo area. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 1952, 24, 3-4, 557-562.
5. I. Takashima et al., A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 8, 1943-1947.
6. 山口 宏樹, 好井 健太郎, 荻和 宏明 他, 2017年の北海道におけるダニ媒介脳炎. *IASR*. 2018, 39, 3, 46-47.
7. 好井 健太郎, 守内 玲寧 他, 2016年に北海道で発生したダニ媒介性脳炎症例. *IASR*, 2017, 38, 6, 126.
8. K. Yoshii et al., Epizootiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, 73, 3, 409-412.
9. K. Yoshii et al., A Retrospective Epidemiological Study of Tick-Borne Encephalitis Virus in Patients with Neurological Disorders in Hokkaido, Japan. *Microorganisms.* 2020, 8, 11, 1672.
10. K. Yoshii et al., Unrecognized Subclinical Infection with Tickborne Encephalitis Virus, Japan. *Emerging Infect. Dis.* 2017, 23, 10, 1753-1754.
11. F. X. Heinz and C. W. Mandl. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. *APMIS.* 1993, 101, 735-745.
12. F. X. Heinz et al., Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine.* 2007, 25, 43, 7559-7567.
13. N. Chiba et al., Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. *Vaccine.* 1999, 17, 11-12, 1532-1539.
14. E. De Clercq, A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011, 51, 1-24.
15. P. Niyomrattanakit et al., Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel. *J. virol.* 2010, 84, 11, 5678-5686.
16. E. De Clercq et al., Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 704-720.
17. E. De Clercq, Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* 2004, 30, 2, 115-133.
18. L. Eyer et al., Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 9, 5483-5493.
19. H. Ji et al., Next generation sequencing of the hepatitis C virus NS5B gene reveals potential novel S282 drug resistance mutations. *Virology.* 2015, 477, 1-9.
20. X. Tong et al., In vivo emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *J. Infect. Dis.* 2014, 209, 5, 668-675.

未知のウイルスを発見し、パンデミックを未然に防ぐ

Discovery of unknown viruses, and prevention the pandemics

水谷 哲也
Tetsuya Mizutani

東京農工大学農学部附属 感染症未来疫学研究センター (センター長・教授 獣医師・博士(獣医学))
Center for Infectious Diseases Epidemiology and Prevention Research: CEPIR
Tokyo University of Agriculture and Technology (PhD, DVM. Professor, Director)

KEYWORD ▶

新型コロナウイルス

ブニヤウイルス

未来疫学

2019年、中国の武漢市で新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症が発生してから3年以上が経過した。2022年にオミクロン変異株が出現してから日本における致死率は減少したが、感染者数は減少したわけではない。今後、オミクロン株以外の変異株が出現しなければ、数年で終息の兆しがみられると考えられる。しかし、新型コロナウイルス感染症が終息しても次のウイルス感染症は必ず出現してくる。そのときには対策が後手に回らないようにしなければならない。本稿では新型コロナウイルス感染症を振り返りながら、次の新興ウイルスの出現と対策について考察していきたい。

次の新興ウイルス感染症も コロナウイルスなのか

01

21世紀はコロナウイルスの時代である、と言っても過言ではない。もちろん100年ごとに流行する感染症が変わっていくという法則はない。ウイルス感染症はその時代背景や環境に応じて出現し蔓延する傾向がある。2002年に中国の広東省に出現した重症急性呼吸器症候群(Sever acute respiratory syndrome: SARS)は瞬く間に世界に広まった。もともとキクガシラコウモリに感染していたコウモリコロナウイルスが変異してSARSコロナウイルス(SARS-CoV)になったと考えられている。その後、中国に棲息するコウモリには数多くのコウモリコロナウイルスが感染していることが明らかになったが¹⁾、SARSは約8か月間で終息し2度と出現してくることはなかった。このため、SARS-CoVは偶然にコウモリからヒトに感染したという認識が強く、第2のSARSである新型コロナウイルスの出現を予測していた研究者は少なかったと考えられる。しかし、コウモリのコロナウイルスは虎視眈々とヒトに感染するチャンスをうかがい、2019年にパンデミックを起こしたのである。次もまた新たなコロナウイルスが出現すると考えるのは間違いではなさそうである。

新型コロナウイルスが出現する前触れ

02

しかし、新しいコロナウイルスが出現するという警告がなかったわけではない。2012年には中東で中東呼吸器症候群(Middle East respiratory syndrome: MERS) コロナウイルス(MERS-CoV)が出現し、2017年には中国の広東省で豚急性下痢症候群(Swine acute diarrhea syndrome: SADS) コロナウイルス(SADS-CoV)が出現しているのである(図1)²⁾。SADSは豚のコロナウイルス感染症である。SADS-CoVがヒトに感染したという事例はないが、SARS-CoVが出現した広東省の豚農場でSADSが発生したという事実に、我々はいっとも気を配っても良かったのかもしれない。2017年、SADS-CoVは4か所の農場で発生し、24,000頭以上の子豚を死に追いやった。SADS-CoVが発生する前年には、農場付近の洞窟に棲息するキクガシラコウモリからSADS-CoVと98%の相同性を持つコウモリコロナウイルスが分離されていた。今だから言えることかもしれないが、新型コロナウイルス感染症の出現はSADSが前触れになっていたとも考えられる。つまり、中国にはコウモリのコロナウイルスがヒトや動物に感染するための土壌ができあがっていたのである。

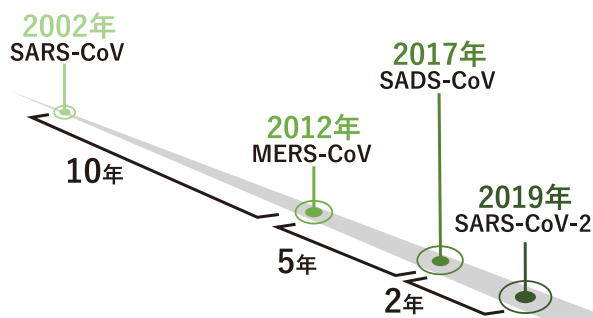


図1 コロナウイルスの出現サイクル

牛にも注意が必要である

03

SADS-CoVは豚からヒトに感染しなかったと書いたが、近い将来には豚とヒトに感染するコロナウイルスが出現しても不思議なことではない。実際にインフルエンザウイルスや日本脳炎ウイルスの感染環では豚が重要な役割を果たしている。豚のような家畜は犬猫などの伴侶動物と同様にヒトに身近な動物である。同じ家畜である牛のコロナウイルスが変異してヒトに感染したと考えられるのがヒトコロナウイルスOC43である。ウシコロナウイルスは多くの動物種が共通して持つシアル酸をレセプターとして利用している。ウシコロナウイルスは変異しながら様々な家畜や野生動物に感染していることが知られている(図2)³⁾。ウシコロナウイルスは成牛にも子牛にも感染するが、冬に成牛が下痢をした場合にはウシコロナウイルスが原因であることが多い。血の混じった便が特徴的なので「冬季赤痢」と呼ばれている。一方、ヒトコロナウイルスOC43は呼吸器に感染し、軽い風邪症状を起こす。ウシコロナウイルスは動物種を越えて感染できるようになったのである。ウシコロナウイルスが再びヒトに感染できるウイルスに変異するかどうかかわからないが、ワクチン接種を含む牛の健康管理を行うことにより、ウシコロナウイルス感染牛の頭数を減らしてウイルスが変異するチャンスを失くすという対策が重要である。

ウイルス複製と体温の密接な関係

04

21世紀がコロナウイルスの時代であるならば、次に出現するコロナウイルスはコウモリ、豚、牛に感染しているウイルスかもしれない、ということを書いてきた。ここで注意しておかなければなら

ないことは、ある動物にウイルスが感染していた場合に、ヒトがその動物の血液に触れたらすぐに感染してしまうのではないだろうか、という誤解があることである。動物種を越えてウイルス感染が成立するための必要条件は、(1)その動物のレセプターを利用できること、(2)細胞の中で効率よく増殖できること、(3)簡単に免疫で駆逐されないこと、(4)体温が一致していること、もしくは体温の差に負けない変異を遂げること、である。(1)から(3)は容易に想像がつくと思われるので、(4)について説明を加える。ウイルスのポリメラーゼ(複製酵素)について図3に示した。恒温動物の体温はほぼ一定に保たれている。たとえば、ヒトは36℃、牛や豚は39℃、鳥は42℃である。ヒトの体温で効率よく複製できるウイルスは、必ずしも牛や豚の体温で増殖できるわけではない。その理由として考えられるのは、ヒトに感染しているウイルスは36℃という環境下で最適なウイルスタンパク質やゲノムの高次構造を保っているが、39℃の牛に感染できたとしても3℃の違いでウイルスのポリメラーゼの構造に微妙な変化が生じてしまい、複製効率が落ちてしまうということが考えられる。複製効率が落ちればウイルス産生量も少なくなり、免疫に駆逐されてしまうのである。この現象を利用したのが弱毒生ワクチンである。ヒトの強毒ウイルスを体温の異なる動物に接種して、その動物の体温で最適に複製できるウイルスに変異させたのが弱毒生ワクチンである。弱毒生ワクチンはヒトの体温ではベストの複製ができないために免疫に駆逐されてしまう。わずか3℃の差でこのようなことが起こるのかという疑問がわくかもしれない。しかし、我々も39℃の熱を出せば寝込んでしまうのと同じように、ウイルスも複製効率が悪くなると考えられないだろうか。このようにウイルスが動物種を越えて感染するためには、その動物の体温に適應できるように変異する必要がある(図3)。図4には中国の湖北省武漢市に出現したコウモリコロナウイルスが変異しながら人類に感染するまでの過程を描いた。

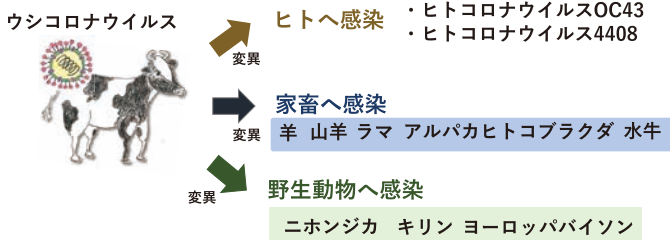


図2 ウシコロナウイルスの感染拡大

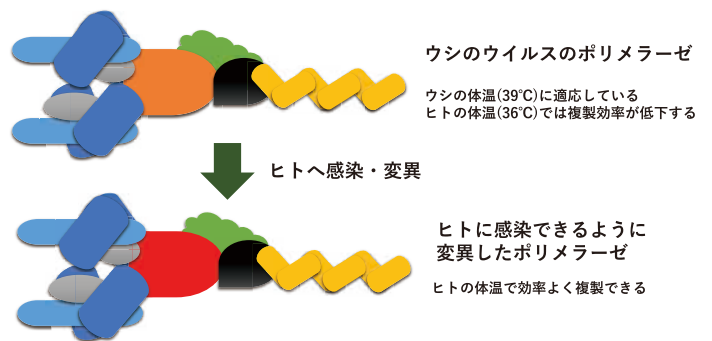


図3 体温の差によるウイルスの適応変異



図4 コウモリコロナウイルスが新型コロナウイルスになるまで

物事には例外がある

05

SARS-CoVは起源となるコウモリコロナウイルスとの相同性が約99%である。元のウイルスなら100%の相同性ではないのか、と考えるのが普通であるが、それには理由が少なくとも3つある。1つめはここまで説明してきた体温の不一致による変異である。コウモリの体温は活動期で40℃なので、ヒトとは4℃の差がある。2つめはコウモリコロナウイルスがヒトに感染したときに免疫から逃れるための変異である。3つめは元のコウモリコロナウイルスのコウモリの中での独自の変異である。SARS-CoVとコウモリコロナウイルスのゲノムの1%の違いは300塩基に相当する。種を越えて感染が成立するためにはこれくらいの数の変異が起こることは当然と考えられる。体温の不一致により変異が生じるという説は一見正しいようであるが、実は例外もある。たとえば日本脳炎ウイルスは蚊と豚とヒトで増殖できる。蚊は変温動物であり、豚の体温は39℃、ヒトは36℃である。この3者を容易に渡り歩くことができる日本脳炎ウイルスは体温の制限を受けていない。もしかするとある程度の制限を受けているのかもしれないし、制限を受けないようなメカニズムが存在しているのかもしれない。これは私たちの研究テーマのひとつであるが、答えはまだ出ていない。

新型コロナウイルス感染症の世界的な感染拡大は景気を後退させる

06

新型コロナウイルス感染症は近年まれにみるほどの規模で社会的混乱を起こした。これから出現してくる可能性のあるウイルスは、(1)新型コロナウイルス感染症のように世界的に影響を及ぼすもの、(2)エボラ出血熱のように極地的だが深刻な影響を及ぼすもの、(3)風邪コロナウイルスのように被害はないとはいえないが通常の医療体制で解決できるもの、などに分けられる。ここでは(1)のようなウイルスが起こす社会的な影響について、新型コロナウイルス感染症を例にして考えていきたい。身近なところから話を進めると、ほとんどの人が外出時はマスクをして、建物の入り口では手指の消毒を行っている。密室状態の家庭内ではマスクを着けていないこと、指にウイルスが付着している人がどれくらいいるのか、などの突っ込みどころはあるが、私たちの習慣に大きな変化をもたらしたことに違いはない。次に国内外の移動に関する行動制限が挙げられる。国内の感染者数をゼロにして、海外からの流入を防げば完璧な防疫を達成できる。これを国策として実施していたのが中国である。日本は中国に比べると緩和された政策をとっていたが、すでにコロナの前の状態に戻っていた欧米の影響を受けてさらに緩和を進めた。一方、新型コロナウイルス感染症は経済活動の在り方にも変革をもたらした。中国経済が停滞すると、日本の中国工場の稼働が止まって自動車などの部品が足りなくなった。このようなサプライチェーンの問題はロシアのウクライナ進行でも浮き彫りとなった。農業を含

む産業資源が豊富ではない日本に対して新型コロナウイルス感染症が重要な課題を投げかけてくれたと考えておこう。金融面では2020年3月にコロナショックと呼ばれる世界的な株価大暴落が起こった。リーマンショックなどの金融破綻に端を発する暴落と異なり、感染症が原因の場合には欧米を中心としたゼロ金利政策による経済支援が功を奏して、短期間で奇跡的な回復をみた。しかし、その結果として2021年からインフレが加速し始め、2022年には欧米などで金利を上昇させてインフレを抑え込もうとした結果、2023年には景気の後退がほぼ織り込み済みとなってしまった。風が吹けば桶屋が儲かる的な発想ではあるが、新型コロナウイルス感染症は世界の景気にまで影響を及ぼしたのである。

新型コロナウイルスの教訓を忘れないように

07

次に出現する新興ウイルス感染症が全世界的に影響を及ぼすために必要な条件は、(1)呼吸器感染症や下痢などを起こす水系感染症であること、(2)急性の重症疾患を起こさないこと、(3)これまでに開発された治療薬やワクチンの効果がないこと、などが挙げられる。蚊媒介性のウイルス感染症は、蚊が棲息する環境が必要であるために全世界的に広まる可能性は低い。一方、口や鼻から感染できるウイルスは世界的に蔓延する可能性が高いことは容易に想像できる。ヒトは必ず空気を吸い込み、食べないと生きていけないからである。ある国で感染症が発生したときに、人知れず感染者数が増加していた方がウイルスに有利に働く。エボラ出血熱のように急性で重篤な疾患を起こすウイルス感染症はすぐに隔離されるので蔓延しにくい。新型コロナウイルス感染症では変異株にもよるが2割程度の感染者が無症状で他人に感染させているといわれている⁴⁾。SARSの終息が早かったのはエボラ出血熱のように重症になる割合が高く、すぐに隔離されたからだと考えられている。新型コロナウイルス感染症のように無症状感染者が海外へ行くことを繰り返せば世界的に感染は拡大していく。それでも、インフルエンザウイルスなどのように新型のウイルスが出現しても、ワクチンや治療薬が効くのであれば、感染者数をある程度抑え込むことは可能である。もしSARSの流行時にワクチンや治療薬が開発されていれば、新型コロナウイルス感染症はこれほどの流行を起こさなかったかもしれない。これを教訓として、新型コロナウイルス感染症が終息してもワクチンや治療薬のバージョンアップを継続し、備蓄する体制を整えていくことは重要な課題である。何年後か何十年後なのかはわからないが、私たちの子孫が新型のコロナウイルスに再び遭遇した時に役立つはずである。

次の新興ウイルスはこれだ!

08

ここからは具体的に次にどのような新興ウイルスが出現して世界的に流行するか、について考えていきたい。ウイルスは大きくDNAウイルスとRNAウイルスに分けられる。つまり、DNAをゲノムとしてもつウイルスと、RNAをゲノムとしてもつウイルスである。一般に、DNAウイルスは複製のときに塩基の挿入ミス(変異)が起こっても修復する酵素を持っていることから、変異のスピードは遅い。一方、RNAウイルスは修復酵素を持たないことから、変異のスピードは速い。コロナウイルスはRNAウイルスの中で唯一修復酵素を持っているが、DNAウイルスほどの修復能力がないために変異が起こると考えるのが妥当である。変異スピードが遅いDNAウイルスはゲノムの塩基配列が安定しているので、治療薬に対する耐性ウイルスもできにくく、ワクチン接種で産生された抗体からエスケープするウイルスも出現しにくい。それに対してRNAウイルスは治療薬やワクチンから逃れるように変異していき、必ずしも重症にならないようなRNAウイルスはさらに蔓延しやすい。主なRNAウイルスを挙げると、レトロウイルス科(ヒト免疫不全ウイルス/HIVなど)、レオウイルス科(ロタウイルスなど)、ポルナウイルス科、フィロウイルス科(エボラウイルスなど)、パラミクソウイルス科(麻疹ウイルスなど)、ラブドウイルス科(狂犬病ウイルスなど)、アレナウイルス科(ラッサ熱ウイルスなど)、ハンタウイルス科(腎症候出血熱ウイルスなど)、ナイロウイルス科(クリミア・コンゴ出血熱ウイルスなど)、フェニウウイルス科(重症熱性血小板減少症候群ウイルスなど)、オルトミクソウイルス科(インフルエンザウイルスなど)、アルテリウイルス科(豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスなど)、コロナウイルス科(新型コロナウイルスなど)、ピコルナウイルス科(ポリオウイルスなど)、アストロウイルス科、カリシウイルス科(ノロウイルスなど)、フラビウイルス科(日本脳炎ウイルスなど)、ヘペウイルス科(E型肝炎ウイルスなど)、トガウイルス科(風疹ウイルスなど)がある⁵⁾。このように豊富なウイルス科の中から、今後出現してくるウイルスを予測することは困難である。しかし、上記のようにウイルスはランダムに出現してくるわけではなく、時代背景を背負って出現してくる傾向がある。そのような意味で、世界的な蔓延の可能性を満たすウイルスは、コロナウイルス科とブニヤウイルス目(アレナウイルス科、ハンタウイルス科、ナイロウイルス科、フェニウウイルス科をまとめたもの)であろう。

ブニヤウイルスに注目せよ

09

近年、ブニヤウイルス目に属する新しいウイルスに関する論文が目立っている。学術論文検索ソフトPubMedを使って「novel bunyavirus isolation(新しいブニヤウイルスの分離)」とサーチしてみると、168の論文がヒットしてくる(2022年12月29日現在)。この中には総説も含まれ、同じウイルスを複数の論文が

報じている場合もあるので、必ずしも168の論文すべてが新たに分離されたブニヤウイルスではないことをご承知おきいただきたい。ブニヤウイルス目の新規ウイルスの筆頭は重症熱性血小板減少症候群(Severe fever with thrombocytopenia syndrome)ウイルス(SFTSウイルス)である⁶⁾。SFTSはダニ媒介性で致死率が高く(10%以上)、主な発生国は中国、韓国、日本である。最近、台湾などでも報告されている。日本では山口県で初発例が見つかり、年々北上を続けている。2022年は中部・関東圏での発生が見られた。SFTSウイルスは多くの動物に感染するが、発症するのはヒト、ネコ、イヌに限られている。そのほかマイナーかもしれない新規ブニヤウイルスを列記していく。南アフリカのオオコモリの外部寄生虫(コモリハエ)から分離されたWolkbergウイルスは、ヒトに感染するアルボウイルスのNyandoウイルスに相同性があり、アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来のVero細胞で複製できる⁷⁾ことから、人獣共通感染症になる可能性を秘めている。私たちも日本のコモリに寄生しているマダニからVero細胞を使って、Soft tick ブニヤウイルスを分離した⁸⁾。このウイルスは様々な哺乳類の培養細胞に感染することが明らかになったので、人獣共通感染症の候補となるかもしれない。米国の蚊からはBrazoranウイルス⁹⁾、トリニダードの蚊からはCumutoウイルス¹⁰⁾、インドの鳥からはCat QueウイルスとBalagoduウイルスが新たに分離されている¹¹⁾。ほかにも多くの新しいブニヤウイルスが世界各国から分離されている。これらのウイルスは人獣共通感染症になるかはまだ分からないが、どのウイルスにもその可能性はある。ブニヤウイルスは蚊やダニからヒトや動物に感染するものと、動物から動物に感染するものなど多彩な感染経路をもっている。最も注意すべきことは、蚊やダニに媒介されるウイルスはすでに体温の障壁をクリアしていることである。吸血昆虫によって媒介されるウイルスを総称してアルボウイルスという。アルボウイルスが吸血昆虫を介してヒトに感染したときに、ヒトからヒトへの感染はまれにしか起こらない。吸血という行為は注射することに似ており、ウイルスが直接血中に打ち込まれ体内の臓器に感染していき、その血液が吸血されて次のヒトや動物に感染していく。したがって、アルボウイルスは爆発的な感染拡大を起こしにくいので、エンデミックやエピソードにとどまることが多い。一方、パンデミックを起こしやすい呼吸器感染症や下痢などの水系感染症は、肺や腸管といった体外に面している臓器が標的になっている。したがって、ブニヤウイルスが標的臓器を変えるように変異したときにはパンデミックを起こす可能性があるといえる。いまのところ、そのような例はない。なお、学術論文として学問的に認知された新規ウイルスについては、当センターの安岡潤子特任教授が詳細な解析を行っており論文を投稿する予定である(JRA畜産振興事業)。

未来疫学が地球を救う

10

ここまで、次に出現する新興ウイルスはコロナウイルスかブニヤウイルスの可能性あることを述べてきた。そもそも未知のウイルスはこの世界にいくつ存在しているのだろうか。「生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学政策プラットフォーム(Intergovernmental science-policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services:IPBES)」によれば、哺乳類や鳥類に感染している未知のウイルスは約170万種類存在しており、そのうち約半数が人獣共通感染症になる可能性があるという。にわかには信じがたい数値であるが、人類はこれからも相当数のウイルスと闘っていかなければならないようである。感染症の防疫は水際対策が基本であるが、新型コロナウイルス感染症を含めほとんどの防疫は後手に回っているために容易に蔓延を許してしまうことになる。そこで、あらかじめ未知のウイルスを発見し検査系だけでも確立しておけば、感染症が発生したときにすぐに原因ウイルスをあぶり出すことが可能になる。このような先回り防疫を真剣に考える学問を東京農工大学では「未来疫学」と呼んでいる。「未来疫学」は東京農工大学の登録商標であり、筆者が所属する「農学部附属感染症未来疫学研究センター」にも組み込んでいる。図5には次の新興ウイルス感染症に立ち向かうために必要な研究全般を示し、その中で当センターが取り組んでいる事業を四角で囲んだ。

- ・ 万能ワクチンの開発
- ・ 万能治療薬の開発
- ・ 野生動物のコントロール
- ・ 食品中の抗ウイルス効果
- ・ 未知のウイルスの発見
- ・ 未来に出現するウイルスの予測
- ・ 動物感染症のリアルタイム把握
- ・ 文系理系関係ない感染症学の発展



図5 新興ウイルス感染症に立ち向かうための研究

鏡によってウイルスの形や大きさ(直径)からウイルス科を想像することも重要である。また、当センターでは牛・豚・鶏・犬・猫に感染するウイルスの網羅的PCR(Dembo-PCRシリーズ)を開発している¹²⁾。このDembo-PCRを用いれば、検体中の既知のウイルスを確認できる。ウイルス分離に成功した場合にはその培養上清から、分離できなかったときには検体から核酸を抽出して、次世代シーケンサー(NGS)による解析を実施する。当センターではMiSeqとMiniSeq(ともにイリミナ株式会社)によりシーケンス解析を行い、得られたリードをNCBIのGenBankに登録されている既知のウイルス遺伝子と相同性検索を行う。既知のウイルスに近いリードがあれば、さらに解析を進めていく。未知のウイルスといっても既知のウイルス科のどれかに当てはまることが多い。それでは、既知のウイルスとどれくらいの相違があれば新しいウイルスといえるのであろうか。ウイルス科によって基準は異なるが、一般に既知のウイルスの塩基配列と80%以下の相同性であれば、新しいウイルスとして解析を進めてよいと考えている。一方、どのウイルス科にも属していないウイルスをGenBankの相同性検索で発見するのは不可能である。しかし、相同性検索でウイルスを発見できなかった場合でも、これまでに見たことのないようなウイルスゲノムがNGSで得られたリードの中に隠れているかもしれない。ウイルス分離と電子顕微鏡写真は検体中に未知のウイルスが存在しているという根拠になる。そして、ひとつひとつのリードをつなぎ合わせる地道な作業が新しいウイルスの発見の近道となる。

次のパンデミックが出現したときには医学だけでなく獣医学も制圧に貢献すべきと考えている。なぜならば、これから出現してくるパンデミックを起こすウイルスは動物由来であるからである。そこでAMEDの研究班の中で「獣医療ネットワーク」の構築を目指している。動物感染症はリアルタイムで情報を共有するシステムがない。そのため、パンデミックに対応することができない。「獣医療ネットワーク」は街の動物病院、全国の獣医師と東京農工大学、国立感染症研究所、日本獣医師会と地方獣医師会、東京大学などの獣医系大学を結びネットワークになる予定である。

未知のウイルスを発見する方法

11

私たちのセンターが取り組んでいる未知のウイルスを発見する事業について紹介していきたい(図6)。運び込まれた検体について最初に行うのはウイルス分離である。ウイルス分離はVero細胞のように多くのウイルスが感染できる培養細胞に検体を添加し、感染細胞中でウイルスが増殖してアポトーシスを起こすのを待つ。検体中にはしばしば宿主由来のプロテアーゼが含まれていることがあり、このプロテアーゼが培養細胞を破壊すると、ウイルスによるアポトーシスと見間違えることがある。そのため、2から3回継代してもアポトーシスが起これば、ウイルス分離に成功した可能性が高い。ウイルスを分離している間に、電子顕微

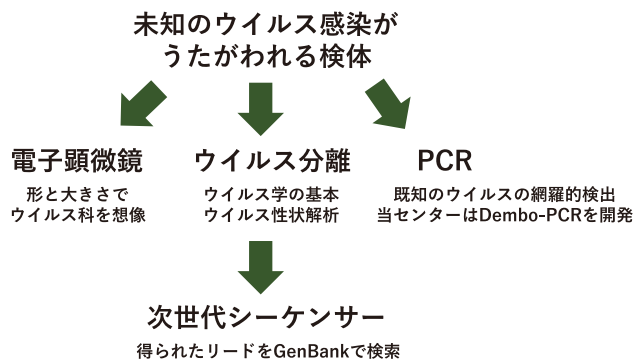


図6 未知のウイルスを発見するためのストラテジー

未知のウイルスに抵抗するために

12

ウイルス感染症を制御するための3種の神器は、ワクチン・検査・治療薬である。インフルエンザはこの3つのツールがそろっているため、人類にとって大きな脅威とはならない。未知のウイルスを発見したときには、何年後、何十年後に人獣共通感染症になる可能性に備えてPCRなどの検査方法だけでも確立しておきたいと考えている。さらに、ウイルスを分解できるプロテアーゼが含まれている食品による感染防御という新しい発想のもとに、当センターの大場真己特任准教授とタカノフーズ株式会社が共同研究を実施している。納豆菌のセリンプロテアーゼが新型コロナウイルスや牛・豚のヘルペスウイルスを分解して感染を阻止できることを論文や学会で報告している(図7)¹³⁾。これも「未来疫学」の研究である。

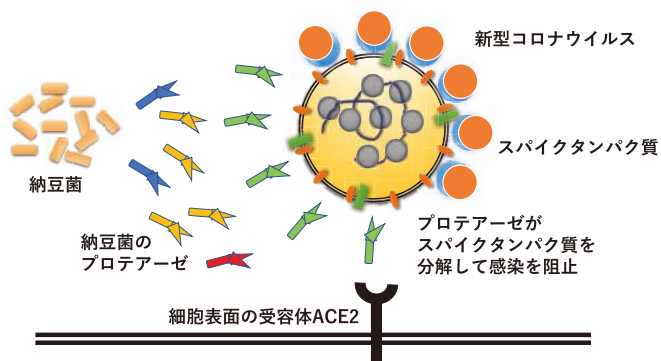


図7 納豆菌のプロテアーゼがウイルスを分解

参考文献

1. Yi Fan, Kai Zhao, Zheng-Li Shi and Peng Zhou. Bat Coronaviruses in China. *Viruses*, 2019, 11, 3, 209.
2. Fabio Scarpa, Daria Sanna, Ilenia Azzena, Piero Cossu, Marta Giovanetti, Domenico Benvenuto, Elisabetta Coradduzza, Ivailo Alexiev, Marco Casu, Pier Luigi Fiori and Massimo Ciccozzi. Update on the Phylodynamics of SARS-CoV. *Life*, 2021, 11, 8, 820.
3. Haitham Mohamed Amer. Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. *Anim Health Res Rev*, 2018, 19, 2, 113-124.
4. NHK, コロナ感染 2割は陽性判明時に無症状 60代以降も高い割合 東京, <https://www3.nhk.or.jp/news/html/20210120/k10012824261000.html>(参照 2023-02-06)
5. 緒方 靖哉, 西山 孝, 土居 克実. 改訂 ウイルス分類. 化学と生物. 2020, 58, 1, 20-33.
6. Xue-Jie Yu, Mi-Fang Liang, Shou-Yin Zhang, Yan Liu, Jian-Dong Li, Yu-Lan Sun, Lihong Zhang, Quan-Fu Zhang, Vsevolod L. Popov, Chuan Li, Jing Qu, Qun Li, Yan-Ping Zhang, Rong Hai, Wei Wu, Qin Wang, Fa-Xian Zhan, Xian-Jun Wang, Biao Kan, Shi-Wen Wang, Kang-Lin Wan, Huai-Qi Jing, Jin-Xin Lu, Wen-Wu Yin, Hang Zhou, Xu-Hua Guan, Jia-Fa Liu, Zhen-Qiang Bi, Guo-Hua Liu, Jun Ren, Hua Wang, Zhuo Zhao, Jing-Dong Song, Jin-Rong He, Tao Wan, Jing-Shan Zhang, Xiu-Ping Fu, Li-Na Sun, Xiao-Ping Dong, Zi-Jian Feng, Wei-Zhong Yang, Tao Hong, Yu Zhang, David H. Walker, Yu Wang and De-Xin Li. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. *N Engl J Med*. 2011, 364, 16, 1523-1532.
7. Petrus Jansen van Vuren, Michael R. Wiley, Gustavo Palacios, Nadia Storm, Wanda Markotter, Monica Birkhead, Alan Kemp and Janusz T. Paweska. Isolation of a novel orthobunyavirus from bat flies (*Eucampsipoda africana*). *J Gen Virol*. 2017, 98, 5, 935-945.
8. Mami Oba, Tsutomu Omatsu, Ai Takano, Hiromi Fujita, Kozue Sato, Atsushi Nakamoto, Mamoru Takahashi, Nobuhiro Takada, Hiroki Kawabata, Shuji Ando and Tetsuya Mizutani. A novel Bunyavirus from the soft tick, *Argas vespertilionis*, in Japan. *J Vet Med Sci*. 2016, 78, 3, 443-445.
9. Robert S. Lanciotti, Olga I. Kosoy, Angela M. Bosco-Lauth, Jan Pohl, Olga Stuchlik, Matthew Reed and Amy J. Lambert. Isolation of a novel orthobunyavirus (Brazoran virus) with a 1.7 kb S segment that encodes a unique nucleocapsid protein possessing two putative functional domains. *Virology*, 2013, 444, 55-63.
10. Albert J. Auguste, Christine V. F. Carrington, Naomi L. Forrester, Vsevolod L. Popov, Hilda Guzman, Steven G. Widen, Thomas G. Wood, Scott C. Weaver and Robert B. Tesh. Characterization of a novel Negevirus and a novel Bunyavirus isolated from *Culex* (*Culex*) declarator mosquitoes in Trinidad. *J Gen Virol*. 2014, 95, 2, 481-485.
11. Shannon L. M. Whitmer, Pragya D. Yadav, Prasad Sarkale, Gouri Y. Chaulbal, Alicia Francis, John Klena, Stuart T. Nichol, Ute Ströher and Devendra T. Mourya. Characterization of Unknown Orthobunya-Like Viruses from India. *Viruses*. 2018, 10, 9, 451.
12. Shinobu Tsuchiaka, Tsuneyuki Masuda, Satoshi Sugimura, Suguru Kobayashi, Natsumi Komatsu, Makoto Nagai, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Mami Oba, Yukie Katayama, Shuhei Kanda, Tadashi Yokoyama and Tetsuya Mizutani. Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR. *J Vet Med Sci*. 2016, 78, 3, 383-389.
13. Mami Oba, Wen Rongduo, Akatsuki Saito, Tamaki Okabayashi, Tomoko Yokota, Junko Yasuoka, Yoko Sato, Koji Nishifuji, Hitoshi Wake, Yutaka Nibu and Tetsuya Mizutani. Natto extract, a Japanese fermented soybean food, directly inhibits viral infections including SARS-CoV-2 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 570, 21-25.

キーワード解説

■ 新興・再興感染症

新興感染症：過去20年～30年間に新たに発見され、地域的あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症。新型コロナウイルス感染症、新型インフルエンザ、エボラ出血熱などが該当する。

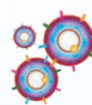
再興感染症：公衆衛生上問題とならない程度にまで患者数が減少していたが、近年再び流行し始め患者数が増加した感染症。デング熱、ジカ熱、結核などが該当する。

■ ワクチン

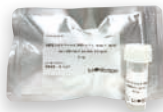
特定の病原体(ウイルスや細菌など)に対する感染予防、または感染してもその症状を軽くすることを目的に接種する物質の総称。病原体に感染すると、その病原体に対する抗体が体内で産生され免疫ができる。ワクチンを接種することで、その病原体に感染しなくても免疫をつけることができる。ワクチンは弱毒化・不活化された病原体そのものや、病原体を構成するタンパク質であることが一般的であったが、新型コロナウイルスではmRNAワクチンが初めて社会実装され注目されている。



ウイルス関連試薬お探しですか？



抗ウイルス抗体



感染症の基礎研究に

ウイルス関連抗体シリーズ

国内で製造した高品質な抗体

- 抗新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗体
- 抗B型肝炎ウイルス (HBV) 抗体
- 抗トリクロジスプラシア・スプヌローサ随伴ポリオーマウイルス (TSPyV) 抗体 など

* 本製品群は、横浜市立大学学術院医学群 梁明秀教授 (現客員教授) との共同開発によって開発されました。



Real-time PCR



Kogene Biotech社リアルタイムPCR試薬

PowerChek™ シリーズ

ポジティブコントロールも付属したオールインワンキット

- 新型コロナウイルスS遺伝子
- サル痘ウイルス遺伝子
- インフルエンザウイルス遺伝子
- 寄生虫 / 熱帯病 / ダニ媒介原因菌遺伝子 など

本製品は試験・研究用の試薬です。ヒトや動物を対象とした医療や臨床診断の目的には使用しないでください。



当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL

<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL

<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。