

2. エボラウイルスと国内の検査体制

下島 昌幸

国立感染症研究所ウイルス第一部

エボラウイルスはヒトに致死率の高いエボラウイルス病を引き起こし、これまで散発的に数百人以下の流行を起こしていた。2013年に始まった西アフリカにおけるエボラウイルス病の流行はこれまでの規模をはるかに上回るものとなり、感染者2万以上、死亡者1万人以上で2015年5月の時点でも終息していない。国立感染症研究所ではエボラウイルス病の実験室診断法（病原体検出法と抗体検出法）を準備・改良しており、この20年で平均して年1回ほど用いられてきたが、西アフリカ3か国からの帰国者で疑い患者とされ検査が行われた件数はこの半年で7件と急増した。本稿ではエボラウイルス病を概説し、国立感染症研究所で準備されている検査法を紹介する。

エボラウイルス病の背景

エボラウイルスによるエボラウイルス病（あるいはエボラ出血熱）は1976年のザイール（現コンゴ民主共和国）における流行により初めて認識され、この時の流行地の川の名前から病原体はエボラウイルスと呼ばれるようになった¹⁾。またいくつかの種があることがその後判明し、この時のエボラウイルスの仲間をザイールエボラウイルス（あるいは単にエボラウイルス）と呼んでいる。ほぼ同時期に隣国スーダン（現南スーダン）でも別の種のエボラウイルスによる流行があり、ウイルスはスーダンエボラウイルスと呼ばれるようになった。ブンディブギョエボラウイルスは比較的最近発見されたウイルスで2007年のウガンダが最初の流行である²⁾。タイフォレストエボラウイルスによるエボラウイルス病は1994年に1回（患者数は一人）発生したのみである³⁾。現在知られているヒトに病原性があるエボラウイルスはこの4種である。

2013年まで20回以上の流行が主にアフリカ中央部の5か国（ザイール（現コンゴ民主共和国）、コンゴ共和国、

ガボン、スーダン（現南スーダン）、ウガンダ）であり、1回の患者数は多くて300-400人程度、ザイールエボラウイルスによる患者数が最も多く累計で1,400人ほどであった（表1）。輸出例は1996年のガボンから南アフリカ共和国への患者の移動（二次感染あり）、1994年のアイボリーコーストからスイスへの患者の移動の2回のみである³⁾。病原性はエボラウイルス種によって異なっており、致死率ではザイールエボラウイルスで80-90%、スーダンエボラウイルスで50%ほど、ブンディブギョエボラウイルスで30%ほどである³⁾（表1）。

ヒトがエボラウイルスに感染する機会は、感染した動物やヒトの血液、体液、嘔吐物、排泄物などに含まれていたウイルスが粘膜面や傷口に付着した場合にある。コウモリやチンパンジーなどの野生動物の肉を食料とする際の狩猟や調理、患者の世話や医療行為を行う際にその機会がある。注射器の使いまわしや葬儀の風習で流行が大きくなった事例もある。ウイルスの伝搬には直接の接触が必要であり、飛沫核を介した空気感染は起こらないと考えられている。感染したヒトでも発症の前であればウイルスの排出量は極めて低く、この時期に他のヒトにウイルスが感染することは考えにくい³⁾。

1989年にはフィリピンからアメリカに輸出したカニクイザルがエボラウイルスに感染していたことが判明し、レストンエボラウイルスという種名が付けられている（米国のサル検疫所の地名バージニア州レストンに由来）。フィリピンの同じサル施設からアメリカに計3回、イタリアに1回、輸出したサルで感染と死亡が生じている³⁾。レストンエボラウイルスはサルには病原性があり死亡させるが、

連絡先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園4-7-1

国立感染症研究所ウイルス第一部

TEL: 042-848-7020

FAX: 042-561-2039

E-mail: shimoji-@nih.go.jp

表1. 2013年までのエボラウイルス病の患者数(累計)

エボラウイルスの種	患者数(計)	死者数(計)	致死率
ザイールエボラウイルス	1,383	1,086	79%
スーダンエボラウイルス	779	412	53%
ブンディブギョエボラウイルス	185	50	27%
タイフォレストエボラウイルス	1	0	0%

*致死率は累計の患者数と死亡者数から算出されたもの

ヒトへの病原性はないようである。ただし抗体が陽性のヒトは見つかっている^{4,5)}。2008年にはフィリピンの養豚施設で流産と呼吸器症状を示す流行があり、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスと豚サーコウイルス、レストンエボラウイルスが検出された⁵⁾。しかし感染実験から、豚に対するレストンエボラウイルスの病原性は無いかがごく低いものと考えられている⁶⁾。

西アフリカにおけるエボラウイルス病

詳細は有馬先生・高田先生の執筆による「西アフリカのエボラウイルス病発生状況」を参照されたい。ウイルスの種は遺伝子レベルではザイールエボラウイルスである。2013年12月に死亡したギニアの子供が推測される最初の患者で⁷⁾、疫学情報等からリベリアおよびシエラレオネも含め他の患者はすべてこの患者に由来するエボラウイルスに感染したものと考えられる^{8,9)}。ヒトからヒトに感染が移る間に遺伝子変異が生じていることが分かっており^{9,10)}、検出系への影響と遺伝子を標的とした治療法の効果への影響が懸念されている。

国内の検査体制

エボラウイルス病の疑い患者がいた場合、保健所や衛生研究所、都道府県から連絡をいただき、流行地への渡航歴や患者・動物との接触歴、他の原因の可能性等の情報をもとに判断し検査を行うこととしている。ただし西アフリカにおけるエボラウイルス病の大流行を受け、21日以内にギニア/リベリア/シエラレオネに滞在していた人に限っては、38℃以上の発熱あるいは患者の体液等との接触歴があり体熱感がある場合は疑似症患者となり、特定・第1種感染症指定医療機関へ搬送し検査の実施を保健所・都道府県と判断することとなった¹¹⁾。ただしリベリアの流行は2015年5月9日に終息宣言がWHOから出され(指標の1つである最長潜伏期間の2倍である42日がリベリアにおける最後の患者から経過したため)、リベリアの滞在は対象外となった¹²⁾。検査を行う場所は国立感染症研究所ウイルス第一部(村山庁舎)であり、検体が到着した場合は昼夜を問わずすぐに検査を開始できるよう普段から準備されている。

国立感染症研究所ウイルス第一部では、エボラウイルス(あるいはその抗体)の有無を判断するため①コンベンショナル RT-PCR, リアルタイム RT-PCR, 抗原検出 ELISA, ウイルス分離による病原体検出法, ② IgG ELISA, IgM-capture ELISA による抗体検出法を構築している。ウイルス分離と IgM-capture ELISA を除き、いずれの検査法も海外の BLS4 施設(英国 PHE や仏国 INSERM, 米国 CDC) との共同研究あるいは GHSAG ラボラトリーネットワークへの参加により、その有用性は評価済みである。国内ではウイルス分離は実験室が BSL4 施設として稼働していないため現時点で行うことはできないが、材料や手法は準備されている。検体材料としてはウイルス濃度が高くなる血液(あるいは血清)が最適であるが、咽頭拭い液や尿も採材しやすくウイルスも含まれやすいので検査に向いた材料となる。

検体は高度な封じ込めと取り扱い者の安全を考慮し BSL3 実験室に搬入し、まずはエボラウイルスの有無を確認するため不活化と核酸抽出を行い、高感度な遺伝子検出が期待されるコンベンショナル RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR の双方を行う。コンベンショナル RT-PCR における検出標的は NP 遺伝子と L 遺伝子であり、更に NP 遺伝子の場合には nested PCR も行なう。リアルタイム RT-PCR における検出標的は L 遺伝子である。複数の RT-PCR や複数の標的、更に nested PCR を用いるのは、より正確な検査結果を得るためである。西アフリカにおけるエボラウイルス病の流行前の検査頻度は平均して年1件ほどであったが、流行後は検査システムの変更もあり頻度が上昇し、2014年秋以降の半年で7件の検査を行っている(5月末時点、表2)。検査結果はいずれもエボラウイルス遺伝子陰性であった。

抗原検出 ELISA (やウイルス分離) による病原体検出法は一般的に感度の面で PCR ベースの検出法に劣るが、変異があるウイルスあるいは新種のウイルスも検出しうるという特色を持つ。PCR ベースの検出法はゲノム配列に依存するためゲノムの変異の影響を直接受けるのに対し、抗原検出 ELISA による病原体検出法はゲノム変異の影響を受けにくい抗原抗体反応によるものであるからである。実例としてブンディブギョエボラウイルスの発見を上げる

表 2 西アフリカからの帰国者（疑似症患者）に対するエボラウイルス病の実験室診断状況

Yrs, sex	Date of symptom onset	Returned from	Test in serum (PCR)
40yrs male	27 th Oct 2014	Liberia	Neg
60yrs male	7 th Nov 2014	Liberia	Neg
20yrs female	8 th Nov 2014	Guinea	Neg
30yrs male	29 th Dec 2014	Sierra Leone	Neg
70yrs female	18 th Jan 2015	Sierra Leone	Neg
40yrs male	15 th Mar 2015	Liberia	Neg
40yrs male	18 th May 2015	Guinea	Neg

ことが出来る。このウイルス種は知られているエボラウイルスの中で最も遅くに見出されたものであるが、他のウイルス種に対して準備されていた抗原検出 ELISA やウイルス分離、IgM-capture ELISA（いずれも抗原抗体反応を用いる）がその発見・同定に有効であった²⁾。

西アフリカのエボラウイルスと検査法

国立感染症研究所で準備しているエボラウイルスの検査法（コンベンショナル RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR）は西アフリカにおけるエボラウイルス病の流行の前に準備されたものであり、5つあるエボラウイルス種のいずれも検出できるよう、プライマーやプローブは出来るだけ保存された領域に設計し、更に一部混合塩基のものを用いている。それまで知られていたエボラウイルスのいずれも検出できるよう構築されている。一方、西アフリカで流行しているエボラウイルスはザイールエボラウイルスではあるが、近年流行したアフリカ中央部のものとは明らかに異なっており、またヒトからヒトに伝播する間に変異を蓄積している^{8, 9, 10)}、国立感染症研究所で準備しているエボラウイルスの検査法が、西アフリカのエボラウイルスも検出できるか検討を行った。

まず NP 遺伝子を検出するコンベンショナル RT-PCR では、ギニア・シエラレオネで分離されたウイルス株（2014年3月から12月に分離された約20株）の塩基配列を見る限りプライマー認識部位に変異が無く、検出可能と推測した。L 遺伝子を検出するリアルタイム RT-PCR ではプライマーとプローブ領域にそれぞれ1塩基ずつ、これまでにない変異が認められた。そこで西アフリカのエボラウイルスのL 遺伝子を部分的に人工合成し、更にプローブも完全に合致するものを用意した。従来のプローブであっても西アフリカの遺伝子配列をほぼ理論値通りに検出できることが判明した。またプローブも完全に一致するものを用いて

も同様の結果が出る、言い換えれば従来のプローブでも検出が十分機能していることが判明した。L 遺伝子を検出するコンベンショナル RT-PCR は実際の作業を行っていないが、プライマーの1つがリアルタイムのものと同じであり、またリアルタイムでの検討結果が良好であったことから、問題なく検出できると推測した。つまりコンベンショナル RT-PCR、リアルタイム RT-PCR のいずれも変異してきているとされる西アフリカのエボラウイルスであっても検出可能であると考えられた。

最後に

感染症に国境はなく、エボラウイルスが国内へいつ侵入するかは分からない。またウイルスは少しずつ変異していく。最新機器や最新技術を積極的に取り入れ、検査法を更に良くしていく努力は続けなくてはならない。また世界の感染症の発生動向にも目を向け、国内に侵入する可能性が高まっていないか、常に注意しておかねばならない。検出面では日本は世界のトップレベルにあると思うが、その一方で感染症対策として必須の治療法や予防法の開発は殆ど取り組まれていない。ウイルスそのものを用いる等してこのような面でも充実した取り組みが行われることを期待する。

参考文献

- 1) Bowen ET, Lloyd G, Harris WJ, Platt GS, Baskerville A, Vella EE. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet*. 1977 Mar 12;1(8011):571-3.
- 2) Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albariño CG, Conlan S, Reeder SA, Quan PL, Lipkin WI, Downing R, Tappero JW, Okware S, Lutwama J, Bakamutumaho B, Kayiwa J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Newly discovered ebola virus associated with

- hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11):e1000212.
- 3) Feldmann H, Sanchez A, Geisbert TW. *Filoviridae: Marburg and Ebola viruses*. 2013. *Fields Virology* 6th edition. Knipe DM and Howley PM. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
 - 4) Miranda ME1, Ksiazek TG, Retuya TJ, Khan AS, Sanchez A, Fulhorst CF, Rollin PE, Calaor AB, Manalo DL, Roces MC, Dayrit MM, Peters CJ. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis.* 1999 Feb;179 Suppl 1:S115-9.
 - 5) Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, Xu L, Zaki SR, Nichol ST, Rollin PE, Townner JS, Shieh WJ, Batten B, Sealy TK, Carrillo C, Moran KE, Bracht AJ, Mayr GA, Sirios-Cruz M, Catbagan DP, Lautner EA, Ksiazek TG, White WR, McIntosh MT. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science.* 2009 Jul 10;325(5937):204-6.
 - 6) Marsh GA, Haining J, Robinson R, Foord A, Yamada M, Barr JA, Payne J, White J, Yu M, Bingham J, Rollin PE, Nichol ST, Wang LF, Middleton D. Ebola Reston virus infection of pigs: clinical significance and transmission potential. *J Infect Dis.* 2011 Nov;204 Suppl 3:S804-9.
 - 7) Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, Soropogui B, Sow MS, Keita S, De Clerck H, Tiffany A, Dominguez G, Loua M, Traoré A, Kolié M, Malano ER, Heleze E, Bocquin A, Mély S, Raoul H, Caro V, Cadar D, Gabriel M, Pahlmann M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Impouma B, Diallo AK, Formenty P, Van Herp M, Günther S. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med.* 2014 Oct 9;371(15):1418-25.
 - 8) Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RS, Park DJ, Kanneh L, Jalloh S, Momoh M, Fullah M, Dudas G, Wohl S, Moses LM, Yozwiak NL, Winnicki S, Matrangola CB, Malboeuf CM, Qu J, Gladden AD, Schaffner SF, Yang X, Jiang PP, Nekoui M, Colubri A, Coomber MR, Fonnio M, Moigboi A, Gbakie M, Kamara FK, Tucker V, Konuwa E, Saffa S, Sellu J, Jalloh AA, Kovoma A, Koninga J, Mustapha I, Kargbo K, Foday M, Yillah M, Kanneh F, Robert W, Massally JL, Chapman SB, Bochicchio J, Murphy C, Nusbaum C, Young S, Birren BW, Grant DS, Scheffelin JS, Lander ES, Happi C, Gevo SM, Gnirke A, Rambaut A, Garry RF, Khan SH, Sabeti PC. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science.* 2014 Sep 12;345(6202):1369-72.
 - 9) Tong YG, Shi WF, Di Liu, Qian J, Liang L, Bo XC, Liu J, Ren HG, Fan H, Ni M, Sun Y, Jin Y, Teng Y, Li Z, Kargbo D, Dafaie F, Kanu A, Chen CC, Lan ZH, Jiang H, Luo Y, Lu HJ, Zhang XG, Yang F, Hu Y, Cao YX, Deng YQ, Su HX, Sun Y, Liu WS, Wang Z, Wang CY, Bu ZY, Guo ZD, Zhang LB, Nie WM, Bai CQ, Sun CH, An XP, Xu PS, Zhang XL, Huang Y, Mi ZQ, Yu D, Yao HW, Feng Y, Xia ZP, Zheng XX, Yang ST, Lu B, Jiang JF, Kargbo B, He FC, Gao GF, Cao WC; China Mobile Laboratory Testing Team in Sierra Leone. Genetic diversity and evolutionary dynamics of Ebola virus in Sierra Leone. *Nature.* 2015 May 13. doi: 10.1038/nature14490. [Epub ahead of print]
 - 10) Hoenen T, Safronetz D, Groseth A, Wollenberg KR, Koita OA, Diarra B, Fall IS, Haidara FC, Diallo F, Sanogo M, Sarro YS, Kone A, Togo AC, Traore A, Kodio M, Dosseh A, Rosenke K, de Wit E, Feldmann F, Ebihara H, Munster VJ, Zoon KC, Feldmann H, Sow S. Virology. Mutation rate and genotype variation of Ebola virus from Mali case sequences. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):117-9.
 - 11) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知, エボラ出血熱の国内発生を想定した行政機関における基本的な対応について (依頼), 平成 26 年 11 月 21 日健感発 1121 第 2 号
 - 12) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知, 「エボラ出血熱の国内発生を想定した医療機関における基本的な対応について (依頼)」の一部改正について, 平成 27 年 5 月 11 日健感発 0511 第 3 号

Ebola virus and laboratory diagnosis in Japan

Masayuki SHIMOJIMA

Special Pathogens Laboratory, Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases

Ebola virus causes Ebola virus disease (EVD) with high case fatality rates in humans and has caused sporadic outbreaks with less than 500 cases. An EVD outbreak in West Africa, which probably started at the end of 2013, has an unprecedented large-scale with more than 20,000 cases including more than 10,000 death and is still ongoing as of May 2015. National Institute of Infectious Diseases has developed laboratory diagnostic methods of EVD to detect pathogens (genes or protein) and antibodies. The methods have been recently used for suspected cases approximately once a year before the outbreak in West Africa, but after the outbreak for 7 times within this 6 months for suspected cases coming back from 3 countries of West Africa to Japan.

