

日生研より

第65巻 第3号(通巻612号)
2019年(令和元年)7月

挨拶・巻頭言

自然科学と人文科学・考
.....野村吉利(2)

レビュー

エボラウイルスの制圧にむけて
～エボラワクチン開発とシエラレオネ
での研究活動～
.....渡辺 登喜子、河岡 義裕(3)

PEDの再発に備えて.....堤 信幸(9)



自然科学と人文科学・考

野村 吉利

地球誕生から46億年、180万年前に誕生した原人から10万年前に出現した新人を経て人類が地球生物界で覇権を握り今日の人類社会の繁栄を築き上げた原点には原始人による“fire”と“tool”の獲得があったといわれている。まさにこの発明こそ“自然科学”の誕生である。そしてこの自然科学誕生の根底には人類を取り巻く原始動植物界の脅威から自己を守り種の存続を図った人類の本能的且つ自己中心的な意思の存在があったはずである。そしてこの意思が同時に言語や文字の発明を基盤とした芸術、宗教さらには経済、政治の分野まで拡がる“人文科学”の誕生の原点ともなった。そして両者ともその意思の宿る人間の脳活動より発現したものである。

爾来この自然科学と人文科学という二つの要素が協調と離反の歴史を重ねながらもそれぞれの道を開拓して前者は物質文明、後者は精神文明の構築という実績を残してきた。この両者の狭間にあって生まれ成長し続けてきたものがとりもおさず人間社会と言えるであろう。

自然科学は20世紀から21世紀にかけて物理学、化学、生物学、医学をはじめ、あらゆる分野で飛躍的發展を遂げ、利便性の追求という人間の飽くなき欲望をみたすための“tool”を人間社会に贈り続けてきた。しかし、その“tool”には宿命的に“諸刃の剣”の本質像が宿され、利用者たる人間社会に正の恩恵のみならず負のリスクをも負わせてきた。この事実は古くは有用金属発掘と鉱害、現代では化石燃料のグローバルな消費拡大とCO₂排出による地球温暖化、さらには原子力発電とその事故による放射能汚染、医薬品開発とそれに伴う薬害、血液製剤開発とそのエイズ汚染など枚挙に暇がない事例で実証されてきた。一方、人文科学分野においても民主主義、社会主義といった政治理念や自由経済、統制経済といった経済理念およびこれらを“tool”として運用した政治の場面でも負の裏面の存在が指摘されて久しい。

これら両科学分野に共通して見られてきた負のリスク回避の困難性は何に起因したのであろうか？ その根本的要因としてあげられるのは研究開発やその成果の運用に当たる当事者すなわち研究者、政治家、実業家などの心奥部に宿命的に定着した「正の恩恵享受の願望を優先するあまり裏面に隠れた負のリスクの先見検証を怠る」という深層意識である。そしてその意識は基本的には利己から脱却できない人間の本質的精神構造すなわち“業”に由来したものと考えられる。この“業”を制御して健全な正の果実創出に導くには自然、人文両科学分野の研究ならびに運用者さらにはその母体たる全社会人に共通して成果の正負両面性を確実に予測する先見性を身に付けてもらうための“tool”が必要となるが、その造成という極めて重要な役割はまさに人文科学の原点たる倫理、哲学を基盤とした“教育”に担ってもらう以外に他の方策は見当たらない。

今や人類は人工知能(AI)による広範な分野での発明、iPS細胞発明による医療新技術開発やヒトDNAのいわゆるゴミ領域からの有用遺伝子の発掘など生命科学の飛躍的發展、さらには探査機による宇宙開発の急速な進展など広範な自然科学分野において豊饒な成果を手中に収めつつある。一方、人文科学分野では第2次世界大戦以降74年間の大戦争回避の実績こそあれ、地域的な国家間の紛争や内戦は後を絶たないばかりか核拡散防止条例やCO₂削減条約の履行遅滞、さらには一国覇権主義の横行など世界平和実現への道を塞ぐ課題が山積している。けだし自然科学分野でのそれに比べて遅々たる人文科学分野の進展が指摘される所以である。その革命的進化が強く望まれるところで、さもなければ両者の狭間にあって育成されるべき人間社会の未来に明るい展望は開けないように考えられる。

(名誉顧問)

エボラウイルスの制圧にむけて ～エボラワクチン開発とシエラレオネでの研究活動～

渡辺 登喜子、河岡 義裕 (東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野)

1. はじめに

エボラ出血熱は、1976年にスーダンとコンゴで初めて確認されて以来、アフリカ諸国で散発的に発生している。2014年から2016年にかけて西アフリカの3カ国（ギニア、リベリア、シエラレオネ）においてエボラ出血熱の大規模な流行が発生し、28,600名以上の感染者と、11,300名以上の犠牲者を出した。また2018年8月1日に、コンゴ民主共和国（旧ザイール）においてエボラ出血熱のアウトブレイクの宣言が出された。世界保健機関（WHO）の発表によると、12月27日までに543名もの感染者が確認され、そのうち357名が死亡している。

今のところ、エボラ出血熱に対する効果的な治療法は存在せず、ワクチンも実用化には至っていない。本稿では、我々の研究室が取り組んでいるエボラワクチンの開発研究およびシエラレオネにおける研究活動について述べる。

2. エボラ出血熱を起こす病原体

1976年、アフリカのコンゴ民主共和国（旧ザイール）とスーダンにおいて、出血熱を発症して死亡する感染症の流行が起こった。本感染症を引き起こした原因ウイルスは発生地の近くを流れるエボラ川に因んで、「エボラウイルス」と名付けられた。エボラ出血熱の致死率は高く、約90%に達することもあるため、エボラウイルスは人類が発見した最も危険なウイルスの一つであるとみなされている。

エボラ出血熱の一般的な症状は、突然の発熱、筋肉痛、頭痛、喉の痛み等から始まり、それらはマラリアの症状にも似ている。その後、嘔吐、下痢、発疹、肝機能および腎機能の異常等の症状を呈し、さらに病気が悪化すると出血傾向が認められる（ただし出血症状を伴わない感染例も多く報告されているため、最近ではエボラ出血熱を「エボラウイルス

病」と呼ぶことも多い)。エボラウイルスのヒトへの感染は、感染した動物やヒトの血液・体液・嘔吐物・排泄物等と直接接触することによって起こる。また犠牲者の葬儀・埋葬の際に、会葬者が遺体に直接接触するという地域の伝統的な風習もエボラウイルスの感染伝播に寄与する。

エボラウイルスは、mRNAと相補的な一本鎖RNAをゲノムとして持つエンベロープウイルスである。ウイルスRNAには、少なくとも8種類のウイルス蛋白質（NP、VP35、VP40、GP、sGP、VP30、VP24およびL）がコードされている（図1）。ウイルスの表面糖蛋白質であるGPは、ウイルスと宿主細胞表面上の受容体との結合、およびウイルスエンベロープと宿主細胞膜との融合を担うとともに、中和抗体の主要な標的抗原でもある。そのためエボラワクチンの開発では、ワクチン接種者において、GPに対する中和抗体を効率よく誘導させることが重要な目標となっている。

3. エボラワクチンの開発研究

1) 西アフリカにおけるベクターワクチンの臨床試験

エボラウイルス発見からこの40年の間に様々なタイプのワクチンの開発研究が進められてきたが、その中でも有望なエボラウイルスワクチン候補として期待されているのが、チンパンジー・アデノウイルス3型（ChAd3）と水疱性口炎ウイルス（VSV）をベクターとして用いた2種類のベクターワクチン（それぞれ“ChAd3-ZEBOV”および“rVSV-ZEBOV”と呼ぶ）である[1-2]。2014～2016年の西アフリカにおけるアウトブレイク中に、これら2種類のベクターワクチンの臨床試験が実施された。

ChAd3-ZEBOVは、ウイルス蛋白質の合成を誘導する初期遺伝子であるE1領域を、エボラウイルスの表面糖蛋白質GPに置き換えており、E1蛋白質を発現する細胞株でのみ増えることができる。リ

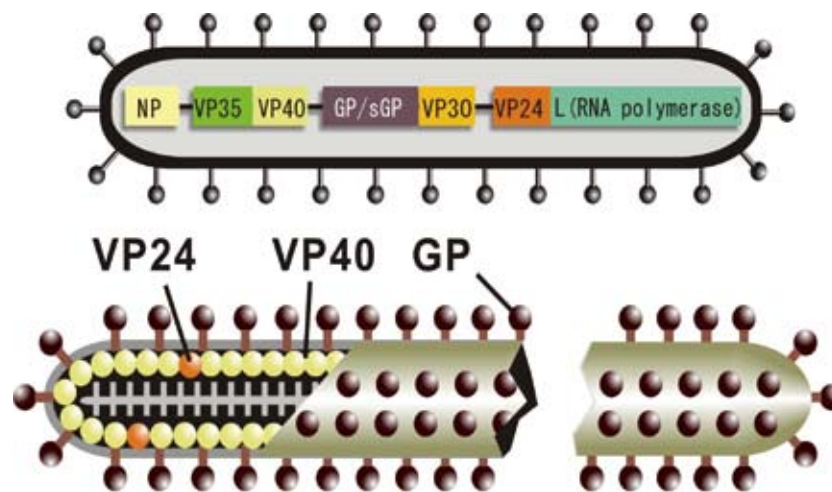


図1 エボラウイルスの構造

エボラウイルスのゲノムは、約 19,000 塩基からなる mRNA と相補的な一本鎖の RNA で、少なくとも 8 個のウイルス蛋白質 (NP、VP35、VP40、GP、sGP、VP30、VP24 および L) をコードしている。ウイルスエンベロープには表面糖蛋白質 (GP) が存在し、ウイルス粒子の内側はマトリックス蛋白質 (VP40) が裏打ちしている。ウイルス粒子内部では、核蛋白質 (NP)、VP30、VP35、およびポリメラーゼ蛋白質 L がゲノム RNA と結合し、螺旋状のヌクレオカプシドを形成する。

ベリアにおいて、ChAd3-ZEBOV ワクチンを 500 名の成人に接種したところ、70.8% の接種者において抗体応答が認められた [3]。さらにワクチン接種から 1 年経過した後も、接種者の 63.5% で高い抗体価が検出され、本ワクチンの有効性が示された。感染防御効果の評価を目的とした第Ⅲ相臨床試験も開始されたが、その時、リベリアでの流行が終息しつつあったため、十分な数の被験者を確保することができなかった。ChAd3-ZEBOV は、E1 蛋白質を発現する細胞株でしか増えないため、上述の rVSV-ZEBOV ワクチンと比べると安全性は高いが、免疫に大量のウイルスを必要とすることから、ワクチン製造の効率化が今後の課題となっている。

rVSV-ZEBOV は、VSV の表面糖蛋白質 G をエボラウイルス GP に置き換えたリコンビナントウイルスである。このウイルスは、欠損させた VSV G 蛋白質の働きを、エボラウイルス GP が補うことができるので、生体内で増殖することが可能である。ギニアでのエボラアウトブレイクの最中、1 万人近くの被験者を用いて、rVSV-ZEBOV ワクチンの第Ⅲ相臨床試験が実施された [4]。本ワクチンの安全性と有効性を調べるために、患者が発生した際、その周囲の人々にワクチンを接種するという“リング・ワクチネーション方式”のワクチン接種が行われた。その結果、ワクチンを直ぐに接種した群では接種から少なくとも 10 日間は 1 人も患者が出なかったのに対して、遅れて 21 日後にワクチンを接種した群

では 16 名の患者が発生した。この成績は、rVSV-ZEBOV ワクチンの接種によって感染防御免疫が付与されたことを示している。しかしながら、本ワクチンは生体内で増殖可能な生ウイルスであるため、関節炎や発熱などの副作用が確認されており、今後は安全性の確保について慎重に検討する必要がある。

rVSV-ZEBOV ワクチンはまだ承認されていないが、第Ⅲ相臨床試験を完了した唯一のワクチンであるため、2018 年のコンゴでのアウトブレイクにおいては本ワクチンの接種が進められている。

2) VP30 欠損エボラウイルスワクチンの開発

我々の研究グループでは、効果的で安全なエボラウイルスワクチンを開発するため、エボラウイルスの増殖に必須の遺伝子 VP30 を欠損した変異エボラウイルス (以後、“エボラ Δ VP30 ウイルス”と呼ぶ) を作出した [5]。このエボラ Δ VP30 ウイルスは、通常の細胞では増えないが、VP30 蛋白質を発現する人工細胞で効率良く増殖することができる (図 2)。したがって、エボラ Δ VP30 ウイルスは、特定の人工細胞でしか増えられないため安全である。また、上述の ChAd3-ZEBOV と rVSV-ZEBOV がエボラウイルス由来の蛋白質を GP しか持っていないのに対して、エボラ Δ VP30 ウイルスは、エボラウイルスを構成するほぼ全てのウイルス蛋白質を有するため、より高いワクチン効果が期待される。

我々は、エボラ Δ VP30 ウイルスのワクチンとしての効果を調べるために、 10^7 個のエボラ Δ VP30

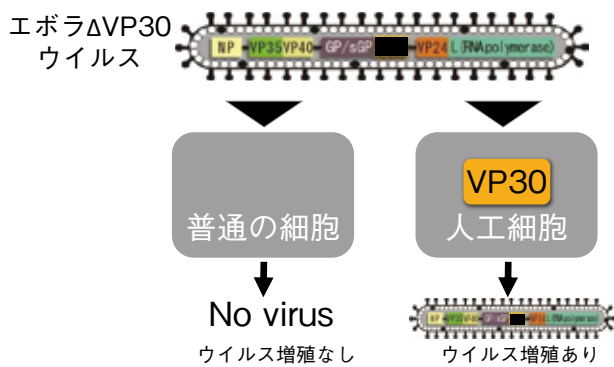


図2 増殖に必要な遺伝子 VP30 を欠損した変異ウイルス、エボラΔ VP30 ウイルス

安全性の高いエボラウイルスワクチンを開発するため、エボラウイルスの増殖に必要な遺伝子 VP30 を欠損した変異ウイルスを作製した。この変異ウイルスは、VP30 蛋白質を発現する特定の細胞では増えるが、普通の細胞では増殖できない。

ウイルスをサルに筋肉内接種し、4 週間後に致死量のエボラウイルスを感染させた。エボラΔ VP30 ウイルスを接種していないサルが全て死亡したのに対して、エボラΔ VP30 ウイルスを接種したサルは生残した [6]。

エボラΔ VP30 ウイルスをワクチンとして使用し、人に接種することを想定する場合、安全性に配慮して、生きていたウイルスの毒性を弱めた生ワクチンではなく、その毒性を取り除いた不活化ワクチンであることが望まれる。より安全なエボラウイルスワクチンを開発するため、我々はエボラΔ VP30 ウイルスの不活化の方法について、1) ガンマ線を用いた方法と、2) 過酸化水素水を用いた方法を検討し、エボラΔ VP30 ウイルスのワクチン効果の評価試験を行った。不活化したエボラΔ VP30 ウイルスのワクチンを 2 回接種したサルに、致死量の野生型エボラウイルスを感染させたところ、ワクチン接種をしなかったグループのサルとガンマ線で不活化したエボラウイルスのワクチンを接種したグループのサルは全て死亡した。それに対して、過酸化水素水で不活化したエボラΔ VP30 ウイルスのワクチンを 2 回接種したグループのサルは全て生き残り、またエボラ出血熱の臨床症状も示さなかった (図 3) [6]。以上の結果から、過酸化水素水で不活化したエボラΔ VP30 ウイルスを免疫したサルは、エボラウイルス感染を防御することが分かった。

本研究結果によって、過酸化水素水で不活化したエボラΔ VP30 ウイルスは、安全性が高く、効果的な新規エボラウイルスワクチンとして有望であるこ

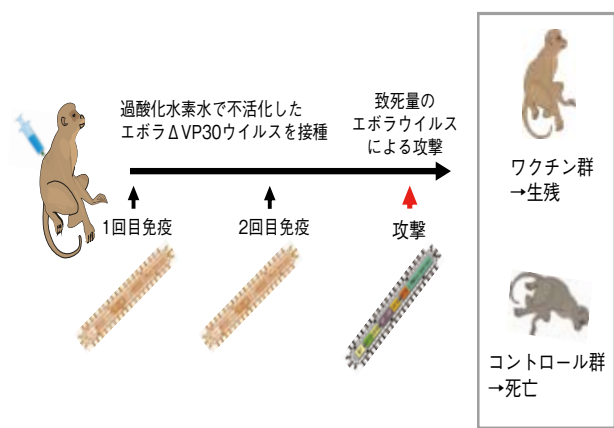


図3 サルにおけるエボラΔ VP30 ウイルスのワクチン効果試験

過酸化水素水で不活化したエボラΔ VP30 ウイルスを 2 回接種したサルを、致死量のエボラウイルスで攻撃したところ、エボラウイルスの感染を完全に防御した。

とが示された。現在、製造管理・品質管理基準 (GMP; Good Manufacturing Practice) 下において本ワクチンを製造中であり、ヒトにおける臨床研究に向けての準備が進んでいる。本ワクチンがエボラ制圧に向けて大きな一歩となることが期待される。

4. シエラレオネにおけるエボラウイルス研究

1) シエラレオネでのエボラ出血熱の流行

シエラレオネ共和国は、西アフリカの西部、大西洋岸に位置しており、北にギニア、南東にリベリアと国境を接する。2013 年 12 月にギニアで発生したエボラ出血熱と 2014 年 3 月のギニアでの集団発生が引き金となり、住民の国境を越える移動により近隣諸国へと拡がり、都市部を巻き込んだ大規模な流行を引き起こした。

WHO の報告によると、シエラレオネにおけるエボラ出血熱の流行は、ギニアとの国境付近にあるソコマという村に住んでいたある一人の祈祷治療師から始まったようだ。2014 年 5 月、彼女はギニアでエボラ患者の治療を行っていた際にエボラウイルスに感染し、ソコマに戻ったのちに発症し死亡した。葬儀において、祈祷師の遺体を洗い清めた数名の女性たちがウイルスに感染し、そこから徐々に感染が拡がっていった。2014 年 7 月、ついにエボラ出血熱は人口 100 万人近くの首都フリータウンに侵入し、同年 7 月 31 日、シエラレオネ大統領は非常事態宣言を発し、それに続いて 8 月 8 日、WHO が「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」を宣言した。

2016年1月に終息宣言が出されるまで、エボラ出血熱は猛威を振るい続け、シエラレオネにおけるエボラウイルス感染者の数は14,124名にもものぼり、最も感染者の多い国となった（2016年3月13日のWHOの報告による）。本感染症の流行は、シエラレオネにおける医療体制、農業生産、教育体制などに大きな影響を及ぼし、同国の経済・社会基盤に大打撃を与えた。

2) シエラレオネにおける共同研究の立ち上げ

上記のような状況の中、我々はシエラレオネ大学のAlhaji N'jai博士とFoday Sahr博士の多大なる協力を得ながら、シエラレオネにおいて共同研究体制を構築していった。2014年12月25日、我々はAlhaji N'jai博士とともに、シエラレオネの首都フリータウンに赴いた。流行の最中であったため、人々の外出は規制されており、例年のクリスマスシーズンならば多くの人々でごった返すダウンタウンも人出は少なく、ゴーストタウンのような様相を呈していた。シエラレオネでは、エボラウイルス感染対策として、空港やホテルなどで体調や体温のチェックが常時行われ、建物内に入る際には、消毒液による手指の消毒が徹底されていた（図4）。また市内各所にも簡易検査所が設けられ、通行人や通

過する車を止めて、体温チェックや消毒液による手指の消毒を行っていた（図4）。

本共同研究について、シエラレオネ大学、シエラレオネ政府、ならびにWHO関係者と協議を行った結果、シエラレオネ大学および関連医療機関からの協力を得ることができ、エボラ患者用の病棟を有する病院の一角にある実験室を貸与してもらえらることとなった。2015年2月には、エボラウイルスを扱うための設備や機器類を実験室内に設置し、また、エボラウイルス感染サンプルの取り扱いに際し、Standard Operating Procedure（標準操作手順書；SOP）を作成し、安全に実験を遂行するための実験システムを確立することができた（図5）。

3) エボラ感染者における宿主応答解析

上記のように、実験システムを確立したのち、我々は、シエラレオネ大学および関連医療機関と連携して、感染の様々なステージ（感染初期・中期、死亡前、あるいは回復後）のエボラ感染者から血液サンプルを採取した。サンプルを採取した患者の総数は20名であり、そのうち生存者は11名であり、死亡者は9名だった。また、コントロール群として10名の非感染者からも血液サンプルを採取した。11名の生存者からは、1) 発症時、2) 第一回目の



図4 エボラ流行当時のシエラレオネの様子

a) シエラレオネのルンギ国際空港。ブリュッセルからの直行便が到着したところ。

b, c) 空港では、エボラウイルス感染対策として、Health Report による体調のチェックや検温が行われていた。

d, e, f) 市中各所で、体調や体温のチェックおよび消毒液による手指の消毒が常時行われていた。またエボラ患者の遺体には触れないようにと、注意を促すポスターが至る所に貼られていた。

採血から5～7日後、3) 第二回目の採血から5～11日後、というように合計3回の経時的サンプリングを行なった。採取した血液サンプルから分離した血漿と末梢血単核球を用いて、プロテオーム(蛋白質)・メタボローム(代謝物)・リピドーム(脂質)・トランスクリプトーム(遺伝子)を包括的に調べるマルチオミックス解析を行なった(図6)[7]。

プロテオーム解析の結果から、死亡者において血漿中の膵分泌に関わる蛋白質(膵トリプシン、膵リパーゼなどの膵酵素)の発現量が多いことが分かり、エボラウイルス感染が膵臓障害を引き起こし、大量の膵酵素が血中に放出されることによって、他臓器の障害や血液凝固不全などの全身症状につながる可能性が示唆された。またトランスクリプトーム解析から、重症患者の体内で起こる組織障害には、好中球によって誘起された免疫系の異常反応が関与する可能性が示され、エボラ出血熱の重症化メカニズムの一端が明らかとなった[7]。

さらに、メタボローム・リピドーム・プロテオ-

ム解析の結果から、エボラウイルス感染後の生死と相関がある因子群を同定した。これらの因子はエボラ出血熱が重症化するかどうかを予測するバイオマーカーとなることが期待される。中でも血漿中代謝物であるL-スレオニンと血漿中蛋白質のビタミンD結合蛋白質がバイオマーカーとして最も有望であることが明らかとなった[7]。これらの因子は、エボラ出血熱の重症化を予測しうる有望なバイオマーカーとなりうると思われる。本研究から得られた知見は、今後のエボラ出血熱の流行発生時における公衆衛生対策に大きく貢献することが期待される。

5. おわりに

2014～2016年の西アフリカにおける大規模なアウトブレイクでは、欧米諸国でも、流行地から帰国した医療関係者を中心に、十数名の感染者が出ており、また日本でも感染者こそでなかったが数名の疑



図5 シエラレオネ大学および関連医療機関との共同研究

a) 我々は、2014年12月より、シエラレオネ大学および関連医療機関と共同研究を開始した。写真右から、共同研究者であるシエラレオネ大学のAlhaji N'jai博士とFoday Sahr博士、および米国ウイスコンシン大学のPeter Halfmann博士。左端が筆者(河岡)。
 b) エボラ患者を収容する隔離病棟で働く、エボラ感染から回復した生存者の方々。自分のコミュニティから拒絶され、戻れない境遇の生存者が、エボラ病棟で働くというケースも多かった。
 c, d, e) エボラ患者用の病棟を有する病院の一角にある実験室を貸与してもらい、エボラ患者から採取した血液サンプルの処理・解析を行っている。c) 実験室のある建物。d) 実験室内の様子。グローブアイソレーター内でサンプルを取り扱う筆者(渡辺)。e) サンプル採取や情報収集などの研究協力を行ってくれたラボテクニシャンの方々和我々の研究室から派遣された研究者。右端から一人目が福山聡特任准教授。右端から二人目が山下誠特任教授。後方列の左から三人目が前村忠特任研究員(当時、博士課程三年目の大学院生)

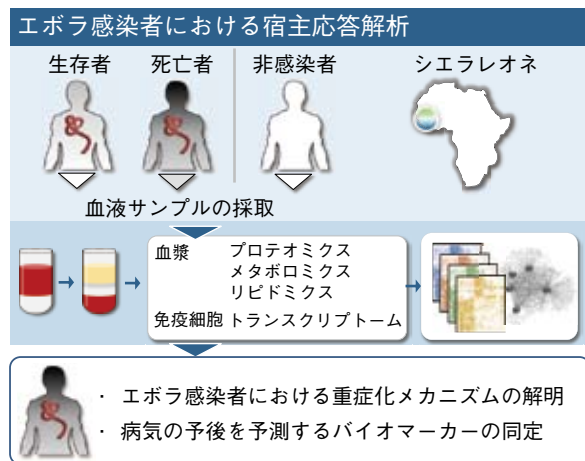


図6 エボラ感染者における宿主応答解析

シエラレオネにおいて、エボラ患者から採取した血液サンプルを用いて、トランスクリプトーム、メタボロミクス、リポドミクス、プロテオミクスなどのマルチオミクス解析を行なった。その結果、エボラウイルス感染後に死亡した患者において、膵酵素分泌や、好中球によって誘起された免疫系の異常反応が組織障害に関与することが示された。さらに重症患者において特異的な発現パターンを示す宿主因子が同定され、これらの因子は病気の帰結を評価しうるバイオマーカーとして有望であることが分かった。

似患者が出た。各国間での人と物の往来が頻繁になっている現代社会においては、日本を含む諸外国にもエボラ出血熱が侵入する可能性は大いにあるため、エボラ出血熱問題は早急に解決すべき国際的課題として取り組む必要がある。

2015年、東京都武蔵村山市にある国立感染症研究所村山庁舎のバイオセーフティーレベル4 (BSL4) 施設が、30年ぶりに稼働することとなった。さらに長崎大学においてもBSL4施設の設置が検討されている。我が国において、エボラウイルスなど危険度の高い病原体が引き起こす感染症に対する予防・診断・治療法を確立するための研究が進むことは、自国を感染症から守るためだけでなく、グローバルな感染症対策において日本が国際的に貢献するためにも重要である。

引用文献

1. Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, Klenk HD, Sullivan NJ, Volchkov VE, Fritz EA, Daddario KM, Hensley LE, Jahrling PB, Geisbert TW: Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11, 786–90 (2005)
2. Stanley DA, Honko AN, Asiedu C, Trefry JC, Lau-Kilby AW, Johnson JC, Hensley L, Ammendola V, Abbate A, Grazioli F, Foulds KE, Cheng C, Wang L, Donaldson MM, Colloca S, Folgori A, Roederer M, Nabel GJ, Mascola J, Nicosia A, Cortese R, Koup RA, Sullivan NJ: Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge. *Nat Med* 20, 1126–9 (2014)
3. Kennedy SB, Bolay F, Kieh M, Grandits G, Badio M, Ballou R, Eckes R, Feinberg M, Follmann D, Grund B, Gupta S, Hensley L, Higgs E, Janosko K, Johnson M, Kateh F, Logue J, Marchand J, Monath T, Nason M, Nyenswah T, Roman F, Stavale E, Wolfson J, Neaton JD, Lane HC; PREVAIL I Study Group: Phase 2 Placebo-Controlled Trial of Two Vaccines to Prevent Ebola in Liberia. *N Engl J Med* 377, 1438–1447 (2017)
4. Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M, Carroll MW, Dean NE, Diatta I, Doumbia M, Draguez B, Duraffour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Gsell PS, Hossmann S, Wattle SV, Kondé MK, Kéïta S, Kone S, Kuisma E, Levine MM, Mandal S, Mauget T, Norheim G, Riveros X, Soumah A, Trelle S, Vicari AS, Røttingen JA, Kieny MP: Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ca Suffit!). *Lancet* 389, 505–518 (2017)
5. Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y: Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1129–33 (2008)
6. Marzi A, Halfmann P, Hill-Batorski L, Feldmann F, Shupert WL, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y: Vaccines. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates. *Science* 348, 439–42 (2015)
7. Eisefeld AJ, Halfmann PJ, Wendler JP, Kyle JE,

Burnum-Johnson KE, Peralta Z, Maemura T, Walters KB, Watanabe T, Fukuyama S, Yamashita M, Jacobs JM, Kim YM, Casey CP, Stratton KG, Webb-Robertson BM, Gritsenko MA, Monroe ME, Weitz KK, Shukla AK, Tian M, Neumann G,

Reed JL, van Bakel H, Metz TO, Smith RD, Waters KM, N'jai A, Sahr F, Kawaoka Y: Multi-platform 'Omics Analysis of Human Ebola Virus Disease Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 22, 817-829(2017)

レビュー

PED の再発に備えて

堤 信幸

1. はじめに

豚流行性下痢 (PED) は、コロナウイルスを原因とする豚のウイルス性疾病である。1971年にイギリスで最初に報告され、1977年にベルギーで大流行が起きた。当初は豚伝染性胃腸炎 (TGE) として調査されたが TGE ウイルス (TGEV) が検出されず、1978年に TGEV とは異なるコロナウイルス様粒子として確認された [1]。

PED ウイルス (PEDV) は約 28,000 塩基の一本鎖 (+) RNA ウイルスで、7つの ORF を持つ。最も変異の多いスパイク (S) タンパク質遺伝子の分子系統樹によりグループ I と II に分けられ、グループ I には 1970 年代～1990 年代の欧州株、中国及び韓国の野外分離株、日本、中国及び韓国のワクチン株に加え、S1 遺伝子の 5' 末端に特徴的な挿入と欠損 (474 と 475 番目の間に 6 塩基の挿入、167、176 及び 416 番目にそれぞれ 1、11 及び 3 塩基の欠損) を持つ S INDEL 株が含まれる。グループ II には 2006 年以降のアジア諸国での流行株、2010 年以降の中国分離株、2013 年以降の主な分離株が含まれる。ただし、S タンパク質遺伝子の全長を用いた系統樹と部分配列を用いた系統樹では細部に若干の相違が認められる [2-5]。近年では PEDV の全遺伝子配列に基づき解析が行われ、大きく 2 つの北米グループに分類する方法も試みられている [4, 5]。その場合、S INDEL タイプの株は全て北米グループ 2 に分類されるが、2013 年～2014 年に日本やその他の国で分離された野外株はそれぞれの北米グループに偏りなく属する。2013 年～2014 年の日本での流行株は、

2012 年に中国で分離された AH2012 株より同時期にアメリカや韓国で流行した株と近縁であった [5]。

近年の PED の流行について整理すると、中国では 2010 年の冬に PED の流行が始まり、瞬く間に中国全土に広がった。感染子豚の死亡率はほとんど 100% に達し、結果として 100 万頭以上の子豚が死亡したため養豚産業に甚大な被害を与えた [6]。北米では 2013 年の 4 月にオハイオ州で PED を疑う下痢症状が確認され、5 月に PED と診断された。米国養豚獣医師協会 (AASV) の調査によると、2013 年 4 月には 1 州 12 件であった発生が、6 月には 12 州 218 件、11 月には 19 州 1,373 件、2014 年 10 月には 31 州 8,622 件に達した [7]。日本では、農林水産省消費・安全局の統計を見ると、2013 年 10 月に沖縄、11 月に茨城で単発的な発生がみられた後、12 月には九州で急増、さらに翌年の 2014 年 3 月から 4 月にかけて本州、四国の各県に大規模な流行を引き起こした。ピークは去ったものの、その後も散発的な発生は続いており 2017 年シーズン (2017 年 9 月～2018 年 8 月) においても九州や関東の 8 県から発生報告があり、完全な終息には至っていない [8]。

2013 年から 2014 年にかけて PED の大流行を経験し、養豚現場でのバイオセキュリティに対する意識は全国的に高まった。多くの教訓を得た一方で、発生のピークを過ぎた現在では PED ワクチンの接種率が低下しているため、未だに続いている散発的な発生から再流行の恐れも懸念される。そこで、本稿ではここ数年の間に発表された多くの論文の中から PEDV の環境中での生残能力や伝播力を中心に概観したい。

2. PEDV の環境中での生残能力

最初に、様々な物質に付着した状態での PEDV の生残能力が調べられた [9]。スタイロフォーム（発泡断熱材）、ニトリル手袋、段ボール、アルミホイル、タイベックつなぎ、衣類、金属、ゴムおよびプラスチックの表面に 2.1×10^6 TCID₅₀/mL のウイルスをそれぞれ 200 μ L 付着させ、2 時間乾燥させた。その後、室温（約 25℃）及び 4℃ で保管し、0、1、2、5、10、15、20 及び 30 日後に vero 細胞を用いてウイルス分離が試みられた。検出限界は 2×10^2 TCID₅₀/mL であった。その結果、どの材質でも室温であれば 2 日以内に失活していたが、4℃ では最初の 5 日間で 1 ~ 2 log₁₀ 下がるだけで、最長 15 日まで感染性が確認された。ゴムの表面では 5 日間、金属の表面では 10 日間、アルミホイル、タイベックつなぎ、衣類及びプラスチックの表面では 15 日間感染性が確認できた。

血清中の PEDV を調べた報告 [10] では、4℃ で 2 時間の感作では、pH を 7.2 から 10.2 まで変化させてもウイルス力価に影響はなかった。一方で 40℃ の場合、完全にウイルスが失活するまでの時間は pH7.2 で 90 分間、pH9.2 で 30 分間、pH10.2 で 10 分間であった。

カナダでの 2014 年から 2015 年の調査 [11] では、土手で囲まれた豚の糞を溜める池の堆積物をサンプリングし vero 細胞にてウイルス分離を試みたところ、最初に PED が発生してから 9 か月後にも生き残ったウイルスが確認された。季節は冬から春、夏と過

ぎ、気温は -30℃ から 23℃ まで変化していた。一般的に、コロナウイルスは 56℃ で 10 ~ 15 分間、37℃ で数日間、4℃ では数か月間、凍結状態（-60℃）では何年も感染力を失わない [12]。PEDV も同様に、環境中で安定的であることが分かった。

3. PEDV の伝播力

伝播力については、前半で実験的に伝播力を調べた報告と実際に農場間で起きた感染拡大の解析をした 2 報の論文を、後半ではエアロゾルによる伝播の可能性を論じた報告を同じく 2 報紹介したい。

Gallien ら (2018) はアメリカの non-InDel 株とフランスの InDel 株の水平感染能力について比較を行った (図 1) [13]。40 cm 離れた 2 つの豚房を準備し、糞便などが直接持ち込まれないように豚房間にはプラスチックのパーティションを設置した。そして、感染群の 1 頭の投与豚にはウイルスゲノム量で 10^8 copies/mL (約 10^5 TCID₅₀/mL に相当する) の濃度のウイルス液を 5 mL 経口的に飲ませた。その後、厳密なバイオセキュリティ条件下で飼育及びサンプリングを行った。InDel 株を飲ませた豚及び同じ豚房の接触豚は下痢症状を示したが、隣の豚房の非接触豚は下痢症状を示さなかった。投与豚は投与後 2 日にウイルスを排泄し始め、接触豚の糞便は投与後 5 日にウイルス陽性となった。一方で、non-InDel 株を投与した部屋では接触豚で 1 日後、非接触豚でも 2 日後に深刻な下痢症状を呈した。糞便検査では、全ての非接触豚 (10 頭中 10 頭) が投与後

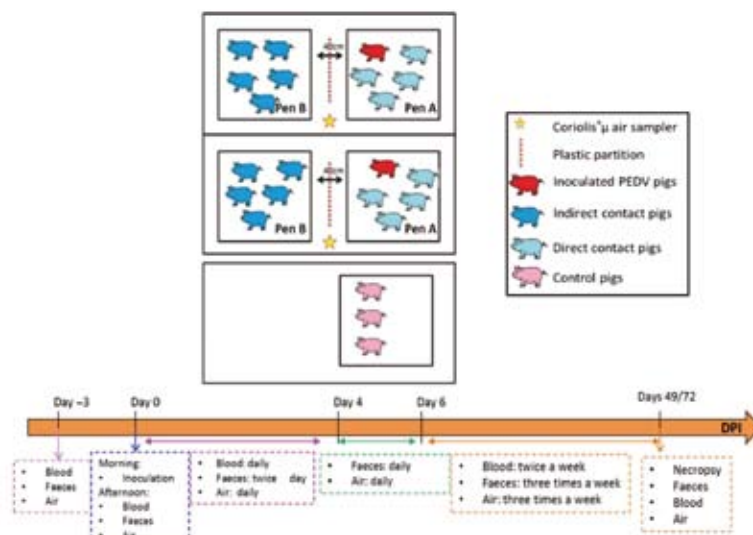


図 1 実験のデザイン (Gallien ら (2018) より抜粋)

2日でウイルス陽性となった。non-InDel株が感染してから抗体陽転するまでの期間が24.8日であったのに対して、InDel株では12.5日と約半分であった。まとめると、2014年にアメリカで分離されたnon-InDel株はInDel株に比較して病原性が高く、同居でもエアロゾルでも感染が起きた。一方でInDel株は病原性が低い代わりに、同居での感染力はnon-InDel株に比較して2.17倍と算出された。

VanderWaalら(2018)はアメリカ中西部に位置するグレートプレーンズにて調査を行った[14]。調査した5か月の間に、10,709回の農場間の輸送が行われ、1回に平均339.7頭、総計360万頭の豚が輸送された。PEDVの感染拡大モデルを解析した結果、最初に感染が起きた地域1へのPEDVの侵入が豚の移動及び餌のトラックに起因すると考えられる確率はそれぞれ72.9%及び20%であった。また、彼らの解析では長距離伝播が餌そのものによって起こったという可能性は排除できなかった。地域1に続いて感染が起きた地域2へのPEDVの侵入は出荷用トラック及び豚のフローに起因するという確率がそれぞれ59.2%及び21.8%であった。彼らのモデルによれば、農場間の伝播は主に動物の移動による直接的なメカニズムと、農場間が地理的に近接しているという間接的なメカニズムによって起きたと結論付けられた。

PEDVが2013年に初めて確認された後、余りにも急速に広がったため、エアロゾルによる伝播の可能性について調査された[15]。Midwest Micro-Tek社製のエアコレクター(集塵機)を30分稼働させて空気中のエアロゾルをサンプリングし、RT-qPCRによりPEDVのウイルス量を測定した。その結果、汚染農場から16km離れた地点で 7.98×10^3 copies/m³のRNAが検出された。ただし、10日齢のPEDV陰性の豚を用いた強制経口投与試験では感染性は示さなかった。Alvarezら(2016)は、養豚場の密集地帯であるアメリカ南東部と中西部の2つの地域について、計2,488農場のPEDVの感染拡大動態を空間的及び時間的に解析した[16]。南東部では、Knox testにより、動物の移動に関係なくPEDVが2km以内で7日以内に伝播したことに有意な関連が見いだされた。中西部では、時間と空間のすべての組み合わせが有意であり、特に1km未満での伝播について期待値が最大となった。総合的

に考えると、特に4.8km未満の距離では、エアロゾルが農場間の伝播に寄与する可能性が示唆された[11]。

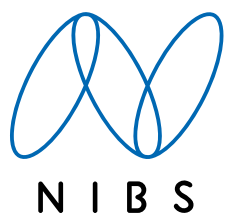
4. まとめ

以上の結果より、アメリカでの事例ではあるが、2013年以降に流行した株は病原性が高い一方で近距離を除いてエアロゾルによる伝播の可能性は低く、主として豚の移動やトラックなどを介して感染拡大したことが推察された。ただし、病原性は低いが接触した場合に感染が起りやすい古典的な株も分離されているため[3-5]、近隣でPEDが発生していないからと楽観視はできない。ありきたりではあるが、PEDVは一般的なコロナウイルスと同様に環境中で非常に長く生残するため、母豚へのワクチン接種による免疫の賦与と日ごろの農場内の清掃・消毒が重要である。有効な消毒薬については農林水産省より提供されている豚流行性下痢(PED)防疫マニュアル(<http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/ped.html>)が詳しいため、再度確認し適切な使用を心掛ける必要がある。

引用文献

1. Pensaert MB, de Bouck P: A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine, *Arch Virol*, 58, 3, 243-247(1987)
2. 農研機構動物衛生研究部門流行性下痢(PED): <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/ped/index.html>
3. 山川睦, 宮崎綾子, 鈴木亨, 大橋誠一, 芝原友幸: 近年の豚流行性下痢(PED)の流行とその疫学のおよびウイルス学的特徴, *豚病会報*, 65, 21-24(2015)
4. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira AR, Collins J, Saif LJ: Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014, *Emerg Infect Dis*, 20, 1620-1628(2014)
5. Suzuki T, Murakami S, Takahashi O, Kodera A, Masuda T, Itoh S, Miyazaki A, Ohashi S, Tsutsui T: Molecular characterization of pig epidemic

- diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014, *Infect Genet Evol*, 36, 363–368 (2015)
6. Wang D, Fang L, Xiao S : Porcine epidemic diarrhea in China, *Virus Res*, 226, 7–13 (2016)
 7. American Association of Swine Veterinarians : <https://www.aasv.org/aasv%20website/Resources/Diseases/PorcineEpidemicDiarrhea.php>
 8. 農林水産省消費・安全局 : <http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/ped.html>
 9. Kim Y, Krishna VD, Torremorell M, Goyal SM, Cheeran MC : Stability of Porcine Epidemic Diarrhea Virus on Fomite Materials at Different Temperatures, *Vet Sci*, 5(1), 21 (2018)
 10. Quist-Rybachuk GV, Nauwynck HJ, Kalmar ID : Sensitivity of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to pH and heat treatment in the presence or absence of porcine plasma, *Vet Microbiol*, 181, 283–288 (2015)
 11. Tun HM, Cai Z, Khafipour E : Monitoring Survivability and Infectivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) in the Infected On-Farm Earthen Manure Storages (EMS), *Front Microbiol*, 7, 265 (2016)
 12. Casanova LM, Jeon S, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD : Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces, *Appl Environ Microbiol*, 76, 2712–2717 (2010)
 13. Gallien S, Andraud M, Moro A, Lediguerher G, Morin N, Gauger PC, Bigault L, Paboeuf F, Berri M, Rose N, Grasland B : Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus, *Transbound Emerg Dis*, 65(6), 1720–1732 (2018)
 14. VanderWaal K, Perez A, Torremorrell M, Morrison RM, Craft M : Role of animal movement and indirect contact among farms in transmission of porcine epidemic diarrhea virus, *Epidemics*, 24, 67–75 (2018)
 15. Alonso C, Goede DP, Morrison RB, Davies PR, Rovira A, Marthaler DG, Torremorell M : Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds, *Vet Res*, 45 : 73 (2014)
 16. Alvarez J, Goede D, Morrison R, Perez A : Spatial and temporal epidemiology of porcine epidemic diarrhea (PED) in the Midwest and Southeast regions of the United States, *Prev Vet Med*, 123, 155–160 (2016)
- (日生研株式会社 学術・安全管理室長)



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)
 (通巻612号) 令和元年6月25日印刷 令和1年7月1日発行(第65巻第3号)
 発行所 一般財団法人日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL : 0428(33)1520(経営企画部) FAX : 0428(31)6166
 URL : <http://nibs.lin.gr.jp/>
 発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/安田早織(委員長)、古澤貴章、小野浩輝
 事務/経営企画部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)