

科学的な視点と、実働性、倫理性への配慮、得られる情報と知識の集約によって得られるはずの成果と可能性を最大限に活用し今後の対策に活かしていくことを忘れてはならない。

#### Q&A

Q-1: 国際機関の対応の遅れが繰り返し非難されているが、研究開発面での対応は本来ならどうコーディネートされるべきか、今後どうすべきか。

A-1: 迅速効率的な政府間対話を実現し、どういった研究活動等が必要かを議論するコミットメント形成が必要。

Q-2: Compassionate use に関する現状について WHO のスタンスは具体的にどうか。研究デザインへの影響はどうか。

A-2: 現時点では具体的な（フォーマルなという意味で？）WHO とのコンセンサスはない状況と理解している。ランダム化臨床試験の実施に関しても検討課題は多くある。

Comment-1(France): 明日の講演に先駆けた臨床研究実施にいたるまでの経緯概略を紹介。今後 Johnson & Johnson の Vaccine 治験に参加することを紹介。現地社会的事情を概念化していくことの課題等にふれ、臨床治験も重要だが、Human and Social Science 等現地事情に関わる保健課題について他の研究が進められることも重要、地域社会と人々をどう巻き込んでいくか、今後はそちらにシフトしていく必要性があるとの指摘。（Post-JIKI との関連性はこの時点では言及せず不明）

Q-3: (Italy) EVD 感染流行携帯に国ごとにことなる傾向が示される要因は何か。

A-3: 国ごとの対策の取り方、調整の仕方が質的にも多様であるため、効果の出方が異なっている。たとえば Guinea ではコミュニティの医療に対する偏見等による contact tracing のむずかしさ、それが広く多様な地域に広がっている現実があげられる。

Comment-2: Liberia national response leader

まだ感染対策が鈍らないように支援を頼む。我々の国の成果として、自分たちがリーダーシップをとって Health Worker の体制を強化し、訓練してきたことは次の Outbreak に自分たち自身で対応できる能力を育てることができたと自負している。

様々な分野をまたいだ Partnership development の必要性が明らかとなり、更なる努力が必要とされている。研究開発面での対策強化も必要で、途上国での高度感染管理ラボ施設等の維持機能確立をはじめ、より堅強な Research Capacity が期待される。今後の取り組みを自主性をもって検討する立場であろう、と締めくくられた。

## Special Session: Factors Affecting HIV Care and Outcome- Global Perspective

### 1) Impact of the Ebola Epidemic on HIV care in Macenta, Forest Guinea 2014

David Lauenberger, Mission Philafrica ConakryGuinea (in collaboration with U897-Inserm, Epidemiologie-Biostatistique-Bordeaux, France)

一般のエボラ感染禍の影響で Gueckedou に近い Macenta 地域でこれまで検査治療体制を支援してきたセンターを訪れる HIV・AIDS 感染者患者の医療支援体制へのアクセス状況の量的変化を観察した内容を報告。HIV のみならず日常的な医療サービスへのアクセスが制限される環境が継続している現実をハイライトした。

当該医療センターは HIV 治療に関しては地域唯一の医療施設で、他に TB および Leprosy 患者のケアも担当しているが、一般の医療ニーズにもこたえている。600 人あまりの ARV 治療患者、検査へのアクセス、結核患者を含めた症例確認等を 2013 年および 2014 年の 8-12 月期について比較してトレンドを調査した。結果概要は以下のとおり。

- ・ 一般の outpatient の訪問数 40%減少とそれに伴う HIV、TB 患者の検出への影響
- ・ 新規 HIV 感染症例の治療への参加実現 47%減少
- ・ ARV の dispense 期間（月数）の 26%上昇

本講演に関する質問の内、HIV 感染者に対する EVD 治療の状況詳細を聞くものがあった。しかしながら 3 人のみが対象 HIV 治療コホートで EVD 感染、ARV の影響についてはケース数が少ないことから具体的な因果関係を吟味できる状況ではないとの説明があった。

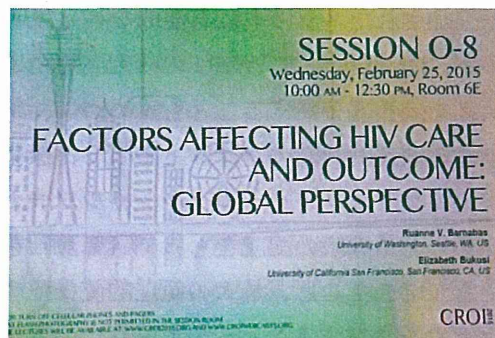
### 2) Favipiravir in Patients with Ebola Virus Disease: Early Results of the JIKI trial in Guinea

Denis Malvy, Inserm U897, University de Bordeaux, France

昨日 Kevin からアナウンスはあったが、印象としては Late-abstract breaker である点で、Audience の動きに大きく影響するまでにはいならず会場はかなり余裕のある状況であった。予備的な情報理解のある聴衆でない分、MSF のイメージ戦略への「乗りやすさ」「Sensitization」には対抗できる状況ではないと思われ、あくまで一般的なとらえ方のレベルに留められた感。治療手段としての可能性を提示できること、その国際的なエボラ対策に対するメッセージ性を十分に評価できないセッティングを選定してしまった状況は否めない。

事前共有された PP t に次ページの懸案の臨床研究デザイン選定の背景説明資料を加えたものをプレゼン資料としていた。

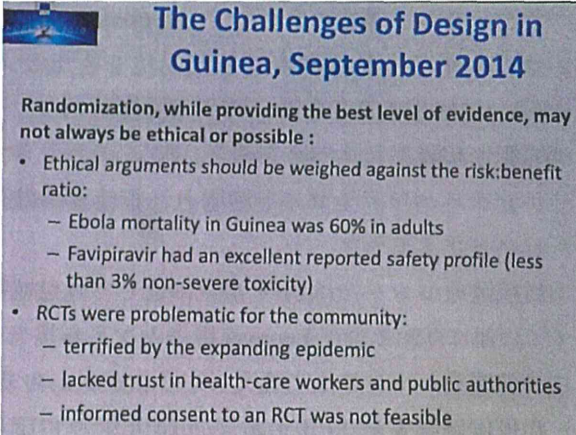
講演後の Q&A では、その研究デザインの意思決定プロセス、背景要因等について詳細説明を求める意見



があげられた。CTに基づく患者 Grouping criteria について、あいまいな Highly severe, severe の概念について、限定的ではあるもののこれまで EVD に関して集積してきた臨床情報から判断・評価することのギャップを指摘、今後治療基準、臨床研究状の Standard regimen の設定根拠についてより詳細に議論がなされるべきだろうとの提案がなされた。

追加されたスライドにも端的な補足説明がなされているが、Dr Malvy は、WHO の研究実施指導上の枠組みを超えている部分があることも認めつつ、現地での臨床研究状の倫理的判断のポイントとして、感染禍にある地域コミュニティリーダーやソーシャルワーカーの協力を得ながら、最大限の配慮をもって研究計画を調整実施することができたこと、最大の倫理的優先配慮の点としてプラセボを設定することへの地域社会の受容性、患者あるいは感染リスクにある地域の心理的安定確保をあげた。

今後は、更なる Research capacity development にむけて現地研究関係者・治療関係者の能力向上をめざす必要があると強調した。



**The Challenges of Design in Guinea, September 2014**

Randomization, while providing the best level of evidence, may not always be ethical or possible :

- Ethical arguments should be weighed against the risk:benefit ratio:
  - Ebola mortality in Guinea was 60% in adults
  - Favipiravir had an excellent reported safety profile (less than 3% non-severe toxicity)
- RCTs were problematic for the community:
  - terrified by the expanding epidemic
  - lacked trust in health-care workers and public authorities
  - informed consent to an RCT was not feasible

\*\*\*

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発推進研究事業）

「エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究」

委託業務成果報告（業務項目②）

### モノクローナル抗体を用いた治療薬の開発

担当責任者 高田 礼人 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター教授

山下 武美 協和発酵キリン株式会社

研究開発本部研究機能ユニット創薬基盤研究所長

#### 研究要旨

ザイールエボラウイルスに対してこれまでに効果が認められている2種類のヒト・マウスキメラモノクローナル中和抗体を産生する CHO 細胞を大量に培養し、上清に含まれる抗体を高度に精製することによって、抗体医薬に求められる純度が確保された製剤を生産した。ザイールエボラウイルス以外の異なる複数のエボラウイルス種に対して中和活性を示すマウスモノクローナル抗体を作出し、水疱性口炎ウイルスシュードタイプシステムを活用したエスケープミュータントの選択と変異アミノ酸の同定によって抗体の認識するエピトープを推定した。

#### A. 研究目的

エボラウイルスはマールブルグウイルスと共にフィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類に感染し、極めて高い致死率を伴う重篤な出血熱を引き起こす病原体である。フィロウイルスの集団感染は現時点においてアフリカに限定されているが、昨今の世界的な交通網の発達により将来的に我が国において集団感染が勃発する可能性は否定できない。

マールブルグウイルスは1種のみが知られているのに対し、現在見つかっているエボラウイルスは系統学的に5種に分けられている（Zaire、Sudan、Tai Forest、BundibugyoおよびReston）。2013-2014年の西アフリカでの流行は、この中でもっとも病原性が高いとされるZaire エボラウイルスが原因である。

現時点においてフィロウイルス感染に対する有効な予防・治療薬は実用化されていない。一方、2013-2014年の過去に類を見ない西アフリカにおける大規模なエボラ出血熱の流行とヨーロッパ

・アメリカを含めた他国への拡散によって、エボラウイルスに対する予防・治療薬開発の必要性・緊急性が認識され、その開発が急がれるなか、未承認薬ながらアメリカで生産された抗体医薬が実際の感染者に使用された。申請者らのグループおよび海外のいくつかの研究グループによるこれまでの研究で、中和抗体を用いた受動免疫が有効である事がエボラ出血熱サルモデルで実証されていたからである。

本研究では、エボラウイルスに対して中和活性を示すヒト・マウスキメラ抗体を複数作出することによって、エボラ出血熱に対する抗体医薬品候補を創出し、実用化を目指す。

#### B. 研究方法

モノクローナル抗体のスクリーニング：

ZaireおよびSudanエボラウイルスのGPを含むウイルス様粒子(VLP)を免疫原として作出した。マウスをZaireウイルスおよびSudanウイルスVLPで免疫し、最終免疫3日後に脾臓を摘出し、ミエローマ細

胞 (P3U1) と融合させ、定法に従ってモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作出した。ハイブリドーマの培養上清を、GPをもつ非増殖性シュードタイプ水泡性口炎ウイルス(VSV)に対する中和活性を指標にスクリーニングした。

エスケープミュータントの選択およびエピトープの決定：増殖性シュードタイプVSVを利用して、エスケープミュータントの選択を行った。すなわち、予めウイルスと抗体を混合し(室温で1時間反応)、単層培養したVero E6細胞に1時間吸着後、寒天培地で抗体存在下で培養しPlaqueを形成させ、中和を逃れた変異体のみ増殖させた。得られたエスケープミュータントのGPの遺伝子およびアミノ酸配列を決定し、親株と比較することによって変異したアミノ酸を同定した。

実際のエボラウイルスを用いた感染性中和試験：中和活性が確認された抗体について、実際のエボラウイルスで同様の中和活性が認められるか否かを、全てのエボラウイルス種を用いたfocus形成阻害試験によって確認した。本実験は、アメリカモンタナ州にあるNIH, Rocky Mountain LaboratoriesのBSL4施設で行った。

ハイブリドーマの大量培養と精製：Zaireエボラウイルスに対するヒトマウスキメラ中和抗体であるch133とch226については、GMP治験薬製造への使用実績のある発現ベクター並びに宿主細胞を用いた生産株を樹立し、これらの抗体生産細胞の培養、精製には、同じくGMP治験薬製造への使用実績のある生産培地及び精製方法を用い、目標とする1g以上の精製抗体を取得し、製剤として保管した。

(倫理面への配慮)

1. 遺伝子組換え実験は、法律の定める条項に従って行った。拡散防止措置に関して、フィロウイルスの遺伝子を含む遺伝子組換え実験は大臣確

認を[24受文科振第516号および22受文科振第1992号および非増殖性のシュードタイプVSVの使用に関する実験は北海道大学より[承認番号26(13)]すでに承認を受けている。

2. 動物実験は、法令ならびに大学あるいは研究機関の定めるガイドラインに従って行った。本研究で計画する動物実験は北海道大学動物実験委員会による承認を受けている[承認番号第13-0136号および第13-0138号]。

## C. 研究結果

交差反応性モノクローナル抗体の性状解析：エボラウイルスは粒子表面に1種類の表面糖蛋白質であるGPを持ち、GPが唯一の中和抗体の標的である(図1) ZaireおよびSudanエボラウイルス抗原を用いてマウスを免疫し、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作出した結果、エボラウイルス表面糖蛋白質を認識し中和活性を示すモノクローナル抗体が得られた。さらに、異なる複数のエボラウイルス種に対する交差反応性を指標に抗体をさらにスクリーニングし、全てのエボラウイルスに対して中和活性を示す交差反応性モノクローナル抗体を1クローン得た。これまでに作出した抗体を含めて合計13クローンの抗エボラウイルス中和抗体は、5種類に分類された(図2)。得られた交差反応性抗体のIC<sub>50</sub>値は非常に低く(0.1μg/ml以下)、ch133とch226と比較すると10倍以上高い中和活性を示すことが明らかとなった。

エスケープミュータントの変異：本交差反応性抗体存在下で、ZaireまたはRestonウイルスのGPをもつ増殖性シュードタイプVSVを培養することによって、エスケープミュータントを選択した。GPのアミノ酸配列を親株と比較した結果、Zaireウイルスでは1箇所、Restonウイルスでは3箇所のアミノ酸変異が認められた。変異したアミノ酸の位置から、本抗体のエピトープはレセプター結合を担っ

ているGP1領域ではなく膜融合に必要なGP2領域に存在することが推定された(図3)。

ch133とch226の大量精製：すでにザイルエボラウイルスに対する効果がサルモデルで確認されているヒトマウスキメラ中和抗体(ch133およびch226)については、協和発酵キリン(株)が保有する抗体発現ベクター及びCHO細胞株を用いて安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞を培養し、上清中に産生された抗体をアフィニティクロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィー、ウイルスの不活化や除去、ろ過などにより精製した。この一連の過程で用いた発現ベクター、宿主細胞、生産培地および精製工程はいずれもGMP治験薬製造への使用実績を有するものである。このようにして得たch133(5.2g)とch226(3.9g)を製剤化して-80℃保管するとともに、一部を分析し品質に問題が無いことを確認した(表1)。

#### D. 考察

エボラウイルスに対する抗体療法には大きな課題が残されている。これまでの研究では、エボラウイルスの中で最も病原性の高いZaireウイルスが主に使用されてきたが、エボラウイルス5種の抗原性が大きく異なっているため(図4)、これまでに世界中で作出されてきたモノクローナル抗体の殆どがZaireウイルスに特異的なのである。我々がこれまでに作出したch133とch226もZaireウイルス特異的である。一方、2000年以降、SudanおよびBundibugyoウイルスによるエボラ出血熱も多発しており、全てのエボラウイルスに効果的な抗体療法が求められている。

エボラウイルス種間の抗原性の違いは、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)亜型間の違いに匹敵する。HAに対する抗体も亜型特異的であると信じられてきたが、申請者および他の研究グループの近年の研究によって、複数の亜型に共通のエピトープが存在し、亜型間交差モノク

ローナル中和抗体の作出が可能であることが近年実証された。その概念と実績をエボラウイルスの種間交差中和抗体の作出に利用した本研究では、全てのエボラウイルス種に共通のエピトープを認識し、かつ中和活性を有する抗体の作出に成功した。本抗体は、その遺伝子を基にしてヒト化あるいはヒトマウスキメラ抗体の作出が可能であるため、今後のエボラ出血熱治療用の抗体医薬シーズとして期待できる。

新たに構築したch133とch226の発現ベクターは、協和発酵キリンが保有する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)強化抗体の生産系にも使用可能である。今回の検討で構築したベクターが良好に機能することが確認されたことから、ch133とch226のADCC強化型抗体の作出および高生産も可能となった。

#### E. 結論

GMPに準拠しないが科学的に品質が担保された抗体製剤を短期間で1g以上を生産できた。さらに、全てのエボラウイルス種を中和するマウスモノクローナル抗体の作出に成功し、エピトープを推定できた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa E, Matsuno K, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Muramatsu M, Kuroda M, Simulundu E, Changula K, Hang'ombe B, Namangala B, Nambota A, Katampi J, Igarashi M, Ito K, Feldmann H, Sugimoto C, Moonga L, Mweene A, Takada A. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (*Eidolon helvum*) Migrating in Africa. *J Infect Dis* (in press).  
Kajihara M, Takada A. Host Cell Factors Involved in Filovirus Infection. *Curr Trop Med Rep* 2:30-40, 2015.

##### 2. 学会発表

Takeyoshi Yamashita and Ayato Takada. R&D Effort with Antibodies for Ebola Virus Disease. 2015 U.S.-JAPAN Medical Biodefense Research Symposium, Rockville, Maryland, USA, February 12-13, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

「全てのエボラウイルス種の感染性を中和するモノクローナル抗体」（出願予定）

2. 実用新案登録

なし

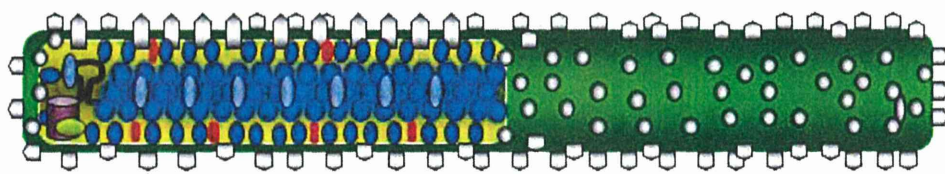
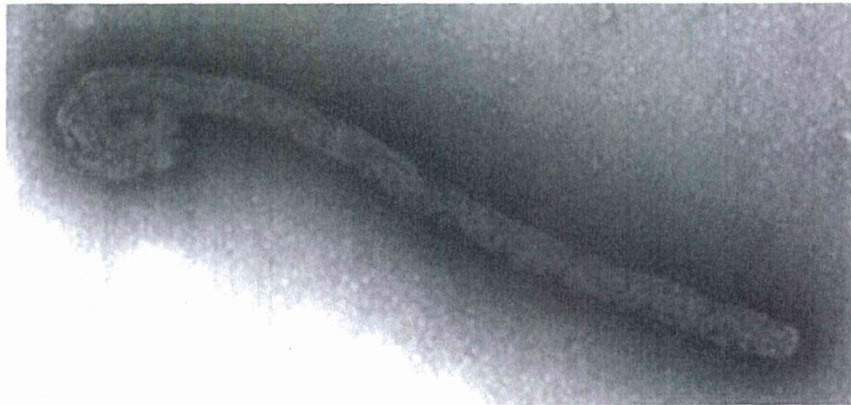
3. その他

なし

表 1. キメラ抗体 2 種 (ch133、ch226) の精製工程の概略および最終精製品の得量並びに品質分析結果

|              | ch133  | ch226                          |
|--------------|--|--------------------------------|
| 抗体生産・精製工程    |  |                                |
| 抗体生産量        | 12.6 g   | 5.9 g                          |
| 精製工程 概略      | Protein A アフィニティー精製<br>↓<br>低 pH 処理 (ウイルスの不活化)<br>↓<br>陰イオン交換クロマトグラフィー (CHO 細胞由来タンパク質および DNA、遊離 Protein A、ウイルスの除去)<br>↓<br>陽イオン交換クロマトグラフィー (凝集体、CHO 細胞由来タンパク質の除去)<br>↓<br>ウイルス除去フィルター (サイズ分離によるウイルスの除去)<br>↓<br>限外ろ過/透析ろ過 (目的タンパク質濃度調整、製剤工程液への置換)<br>↓<br>精密ろ過 |                                |
| 精製抗体取得量      | 5.2 g  | 3.9 g                          |
| 保管条件         |  |                                |
| 製剤処方         | 10 mmol/L グルタミン酸ナトリウム、262 mmol/L D-ソルビトール、0.05 mg/mL ポリソルベート 80 (pH 5.6)   |                                |
| 抗体濃度         | 15.9 mg/mL   | 15.8 mg/mL                     |
| 保存容量・容器・温度   | 330 mL/500 mL ボトル、-80°C凍結・遮光保存   | 249 mL/500 mL ボトル、-80°C凍結・遮光保存 |
| 精製抗体 品質分析    |  |                                |
| 性状 (色、濁り、異物) | 目視確認における異常なし   |                                |
| 純度           | 単量体含量 99.7%  | 単量体含量 99.6%                    |
| エンドトキシン      | 検出限界以下 (0.001 EU/mL 以下)  |                                |





表面糖蛋白質  
レセプター結合/膜融合  
中和抗体の標的

図1 フィロウィルス粒子構造

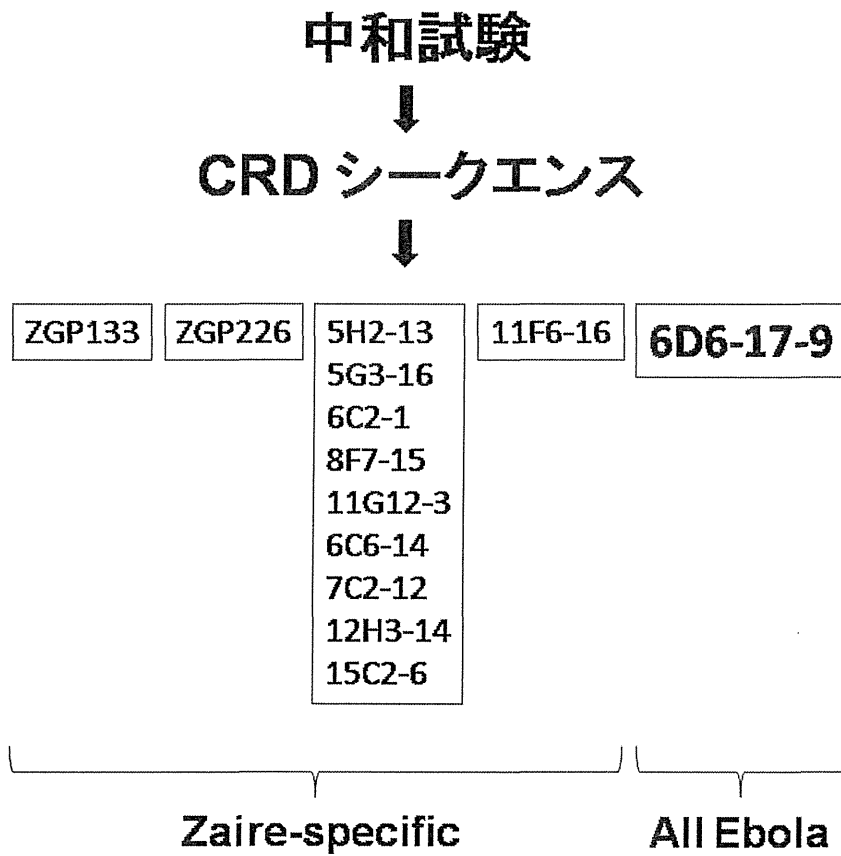


図2 現在保有する中和抗体

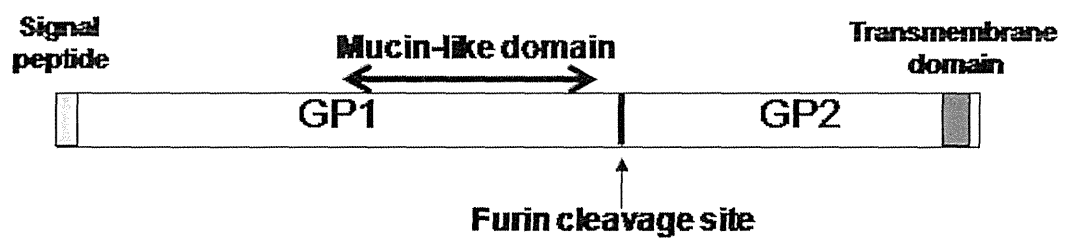


図3 GPの模式図



図4 フィロウィルス遺伝子を基にした進化系統樹

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発推進研究事業）

「エボラ出血熱に対する治療薬、診断薬の開発に関する研究」

委託業務成果報告（業務項目③）

## 迅速かつ高感度なエボラ出血熱の診断法の開発

担当責任者 安田 二郎 長崎大学熱帯医学研究所教授

後藤 浩朗 東芝ヘルスケア社DNA検査システム事業開発部部长

### 研究要旨

迅速・簡便かつ高感度なエボラ出血熱診断法として全5種類のエボラウイルスに対する各種エボラウイルス特異的なRT-LAMP法を開発した。ザイールエボラウイルスに対するRT-LAMP法に関しては、ギニア共和国で採取された臨床検体を用いた実証試験も行き、現行のRT-PCR法と比較して、検出感度、特異性が同等以上であることを確認した。検査時間の大幅な短縮、小型・軽量・低価格な検査機器の採用などにおいて、現行の診断システムより明確に優位性をもつことが示された。

### A. 研究目的

臨床症状のみからエボラ出血熱の診断を行うことは不可能であり、患者の救命、感染拡大の阻止のためには迅速、簡便かつ精確な診断法が求められる。そこで、本研究では迅速・簡便かつ高感度なエボラ出血熱診断法を開発する。

### B. 研究方法

5種類のエボラウイルス（ザイール、スーダン、タイフォレスト、ブンディブギョ、レストン）をそれぞれ特異的に検出することができる高感度・迅速診断法としてRT-LAMP法を開発するために、まず遺伝子データベースをもとにこれまで分離されたエボラウイルス株において各種で高度に保存されている標的遺伝子領域（5' UTRあるいはNP領域）を同定した。それらについて、LAMPプライマーデザインソフトウェア（PrimerExplorer Ver.4）を用い、各標的遺伝子領域に対して4-5セットのプライマーセットをデザインした。

各標的遺伝子領域を含む300-4,000塩基のRNA

をin vitro転写反応により調製し、上記各種プライマーセットのRT-LAMP増幅性能を検証した。各種エボラウイルスにおいて最も増幅効率の高かったプライマーセットを選択し、検出感度、時間、特異性を調べた。海外のBSL-4施設から入手したウイルスRNAを用いた検証も行った。遺伝子増幅の検出は蛍光検出を原理とする小型軽量のリアルタイム検出装置であるGenie III（OPTIGENE社）を用いて行った。

更に、ザイールエボラウイルスに対するRT-LAMP法については、ギニア共和国コナクリ市にある国立ドンカ病院を訪問し、現在のアウトブレイクにおいて採取された患者検体を用いた実証試験も行った。患者情報および標準的な診断法として行われている定量RT-PCR法による検出結果を知らされないブラインド試験にて行った（図1）。

また、遺伝子検出とは原理の異なる新規診断法を開発するために、エボラウイルスVP40タンパク質をGST融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製した。精製VP40を抗原としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体の作製を開始した。

（倫理面への配慮）

ギニア共和国における臨床検体を用いた検証実験の実施に当たっては、患者へのインフォームド・コンセント、患者情報の秘匿化等の条項を含む倫理審査が長崎大学熱帯医学研究所倫理審査委員会およびギニア共和国保健省倫理委員会において行われており、両委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

ザイールエボラウイルスのNPおよび5' UTR、スーダン、タイフォレスト、ブンディブギョ、レストンエボラウイルスのNP領域を遺伝子増幅の標的とするRT-LAMP法（以下、ZNP、ZUTR、SNP、TFNP、BNP、RNPと略す）を開発した。

in vitro転写反応により調製した人工RNAを用いた評価では、すべてのアッセイ法で検出限界が60-400コピー/反応、検出時間20分以内を実現した（表1）。

ウイルスRNAを用いた評価においても、現在広く使用されているRT-PCR法と比べてすべてのアッセイ法で同等あるいはそれ以上の検出感度を示すことが確認された。また、反応特異性についても検証した結果、各アッセイ法は対象とするエボラウイルス種以外のエボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、リフトバレー熱ウイルス、デングウイルス、黄熱ウイルス、インフルエンザウイルス、チクングニアウイルスには陽性反応を示さなかった（表2）。ZNP、ZUTRについては、1976年、1995年、2014年に分離されたザイールエボラウイルスすべてをRT-PCR法と同等あるいはそれ以上の感度で検出可能であることも確認した。

人工RNAの系列希釈液を用い、GenieIIIの検出性能について評価を行ったところ、これまで一般的に用いられてきた反応液の濁度測定を原理とするリアルタイムLAMP検出装置（LA-200、栄研化学）と比較し、同等の検出感度を得ながら検出時間は約1/2に短縮できること、検出可能な最少量のウイルスRNAであっても20分以内に検出可能であることを確認した。

ギニアにおける臨床検体（口腔スワブあるいは血清）を用いた評価では、100検体（陽性47、陰

性53）について、ZNP、ZUTRと現行のSmartCycler（Cepheid社）を用いたリアルタイムRT-PCR法を比較した結果、判定結果はZUTRがRT-PCRと100%一致、ZNPが1例のみ不一致（PCR陽性、ZNP陰性）という結果であった（表3および4）。また、RT-PCRとRT-LAMPの陽性判定にかかる感応時間を比較したところRT-PCRのCt値が低いサンプル（ウイルス量が多い）ではRT-LAMPの判定にかかる時間が短く、RT-PCRのCt値が高いサンプル（ウイルス量が少ない）ではRT-LAMPの判定にかかる時間が長いという相関がみられた（図2）。更に患者情報との照合を行ったところ、低コピー数のウイルスRNAを含む検体、臨床症状からエボラ出血熱と判断されるに至っていない疑い例の患者検体からもウイルスRNAを検出できることが確認された。このことから臨床診断法として有用性が高いことが確認された。また、現地診断ラボスタッフにトレーニングを行い、実際に使用性を評価していただいたところ、現行のリアルタイムRT-PCRと比較して操作が容易であり、結果判定が早い点について高い評価をいただいた。

### D. 考察

今回開発した全5種類のエボラウイルス（ザイール、スーダン、タイフォレスト、ブンディブギョ、レストン）に対する各RT-LAMP法は、現行のRT-PCR法と比較して、検出感度が同等あるいはそれ以上であることが明らかになった。

また、これらのRT-LAMP法は類症鑑別が必要な他のウイルスとは反応せず、高い反応特異性も示された。

今回使用した検査装置 GenieIII（1.7kg）は、現在西アフリカの検査ラボで使用されているSmartCycler（本体10kg+パソコン重量）に比べて小型・軽量かつ低価格（GenieIIIはSmartCyclerの1/3以下の価格）であり（写真1）、さらに検査時間の大幅な短縮を実現している点において、明らかに現行のRT-PCR法による診断システムに対して優位性をもつことが示された。

加えて、GenieIIIはバッテリー搭載型の装置であるため、電力供給のない場所での使用も可能で

あり、アウトブレイクが発生している地域での使用に当たり、高い利便性を有すると考えられる。実際に、今回の検証実験中も停電が頻繁に発生したが、瞬時にバッテリー駆動に自動で切り替わるため GenieIII の検査結果には影響がなかった。

## E. 結論

全5種類のエボラウイルス（ザイール、スーダン、タイフォレスト、ブンディブギョ、レストン）をそれぞれ特異的に検出することができる高感度・迅速診断法としてRT-LAMP法を開発することに成功した。また、ポータブル診断システムとしての優れた利便性も実証された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) Kurosaki, Y., Oloniniyi, O., Sakabe, S., Takada, A., and Yasuda, J.: Establishment of a rapid diagnosis of Ebola virus with a portable device. 7th International Symposium on Filovirus, Washington DC, USA, March 25-29, 2015.

- 2) Jiro Yasuda, Rapid and Simple Detection of Ebola Virus, US-Japan Annual Medical Biodefense Research Symposium, WDC, USA (12-13 Feb.2015)
- 3) Masayoshi Takahashi, Hiroaki Goto, R&D Efforts on Diagnostic Tools for Ebola, U.S.-JAPAN Medical Biodefense Research Symposium, Rockville, Maryland, USA, (12-13 Feb. 2015).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

「ザイールエボラウイルス検出用プライマーセット、アッセイキットおよび増幅方法」、特願2014-258074 (2014. 12. 19出願)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1、各種エボラウイルスに対する RT-LAMP 検出

| Primer set | Artificial RNA template | Copies/rxt | LA-2000(Eiken) |                        | Genie III(Optigene) |                        |
|------------|-------------------------|------------|----------------|------------------------|---------------------|------------------------|
|            |                         |            | Pos            | DT( min) mean $\pm$ SD | Pos                 | DT( min) mean $\pm$ SD |
| EBOV       | ZNP                     | 410        | 3/3            | 20.7 $\pm$ 1.4         | 3/3                 | 16.8 $\pm$ 1.2         |
|            |                         | 41         | 2/3            | 44.2 $\pm$ 21.2        | 1/3                 | 18.4                   |
|            |                         | 4.1        | 0/3            | n.d                    | 0/3                 | n.d                    |
| SUDV       | SNP                     | 320        | 1/3            | 54.9                   | 3/3                 | 13.9 $\pm$ 0.9         |
|            |                         | 32         | 0/3            | n.d                    | 0/3                 | n.d                    |
|            |                         | 3.2        | 0/3            | n.d                    | 0/3                 | n.d                    |
| TAFV       | TNP                     | 140        | 3/3            | 21.8 $\pm$ 2.3         | 3/3                 | 16.5 $\pm$ 1.4         |
|            |                         | 14         | 1/3            | 26.2                   | 0/3                 | n.d                    |
|            |                         | 1.4        | 0/3            | n.d                    | 0/3                 | n.d                    |
| RESTV      | RNP                     | 620        | 3/3            | 18.3 $\pm$ 1.5         | 3/3                 | 14.3 $\pm$ 0.8         |
|            |                         | 62         | 3/3            | 25.7 $\pm$ 3.5         | 3/3                 | 19.0 $\pm$ 1.1         |
|            |                         | 6.2        | 0/3            | n.d                    | 1/3                 | 18.8                   |

n.d : not detected  
DT : detection time

ザイールエボラウイルス (EBOV)、スーダンエボラウイルス (SUDV)、タイフォレストエボラウイルス (TAFV)、レストンエボラウイルス (RESTV)。LA-2000 は従来の濁度検出機器、GenieIIIは蛍光検出機器。



表 2、RT-LAMP 法の特異性 (ZNP と ZUTR)

| Family                  | Species                        | strains    | Primer set |     |
|-------------------------|--------------------------------|------------|------------|-----|
|                         |                                |            | 5'UTR      | NP2 |
| <i>Filoviridae</i>      | <i>Ebola virus</i>             | Zaire76    | +          | +   |
|                         |                                | Zaire95    | +          | +   |
|                         | <i>Reston virus</i>            |            | -          | -   |
|                         | <i>Sudan virus</i>             |            | -          | -   |
|                         | <i>Tai forest virus</i>        |            | -          | -   |
|                         | <i>Bundibugyo virus</i>        |            | -          | -   |
|                         | <i>Marburg virus</i>           | Ravn       | -          | -   |
|                         |                                | Musoke     | -          | -   |
|                         |                                | Angola     | -          | -   |
| <i>Arenaviridae</i>     | <i>Lassa virus</i>             | Josiah     | -          | -   |
| <i>Bunyaviridae</i>     | <i>Rift valley fever virus</i> | MP-12      | -          | -   |
| <i>Flaviviridae</i>     | <i>Dengue virus</i>            | type 1     | -          | -   |
|                         |                                | type 2     | -          | -   |
|                         |                                | type 3     | -          | -   |
|                         |                                | type 4     | -          | -   |
|                         | <i>Yellow fever virus</i>      | 17D        | -          | -   |
| <i>Orthomyxoviridae</i> | <i>Influenza virus</i>         | A/H1N1/PR8 | -          | -   |
| <i>Alphaviridae</i>     | <i>Chikungunia virus</i>       |            | -          | -   |

NA, not amplified within 90 min

表 3、ギニア共和国におけるエボラウイルス診断法実証試験結果

| Method        | qRT-PCR(現行の方法)   |     |     | RT-LAMP   |     |     |          |     |     |
|---------------|--|-----|-----|---|-----|-----|----------|-----|-----|
| Instrument    | Smart Cycler   |     |     | GenieIII  |     |     |          |     |     |
| Reagent       | QuantiTect RT-PCR kit<br>(Qiagen)/LightMix KIT EBOZ<br>(TIB MOLBIOL) |     |     | Isothermal Master Mix (TOSHIBA)                                   |     |     |          |     |     |
| Amp condition | 50°C, 5min<br>95°C, 15min<br>45cycle<br>95°C, 5s; 55°C, 50s          |     |     | Preheat: 42°C<br>Amp&Detection: 63°C, 30min<br>Melting: 95 - 80°C |     |     |          |     |     |
| Primer        | L  |     |     | Trailer (ZUTR)  |     |     | NP (ZNP) |     |     |
|               | total N°   | pos | neg | total N°  | pos | neg | total N° | pos | neg |
| Serum         | 47   | 34  | 13  | 47  | 34  | 13  | 47       | 34  | 13  |
| Oral swab     | 53   | 13  | 40  | 53  | 13  | 40  | 53       | 12  | 41  |
| Total         | 100  | 47  | 53  | 100   | 47  | 53  | 100      | 46  | 54  |

表 4、ギニア共和国におけるエボラウイルス診断法実証試験結果

| trailer |       | qRT-PCR |     |       |
|---------|-------|---------|-----|-------|
|         |       | Pos     | Neg | Total |
| LAMP    | Pos   | 47      | 0   | 47    |
|         | Neg   | 0       | 53  | 53    |
|         | Total | 47      | 53  | 100   |

| NP   |       | qRT-PCR |     |       |
|------|-------|---------|-----|-------|
|      |       | Pos     | Neg | Total |
| LAMP | Pos   | 46      | 0   | 46    |
|      | Neg   | 1       | 53  | 54    |
|      | Total | 47      | 53  | 100   |

| Primer  | Sensitivity | Specificity | PPV  | NPV   |
|---------|-------------|-------------|------|-------|
| trailer | 100%        | 100%        | 100% | 100%  |
| NP      | 97.9%       | 100%        | 100% | 98.1% |

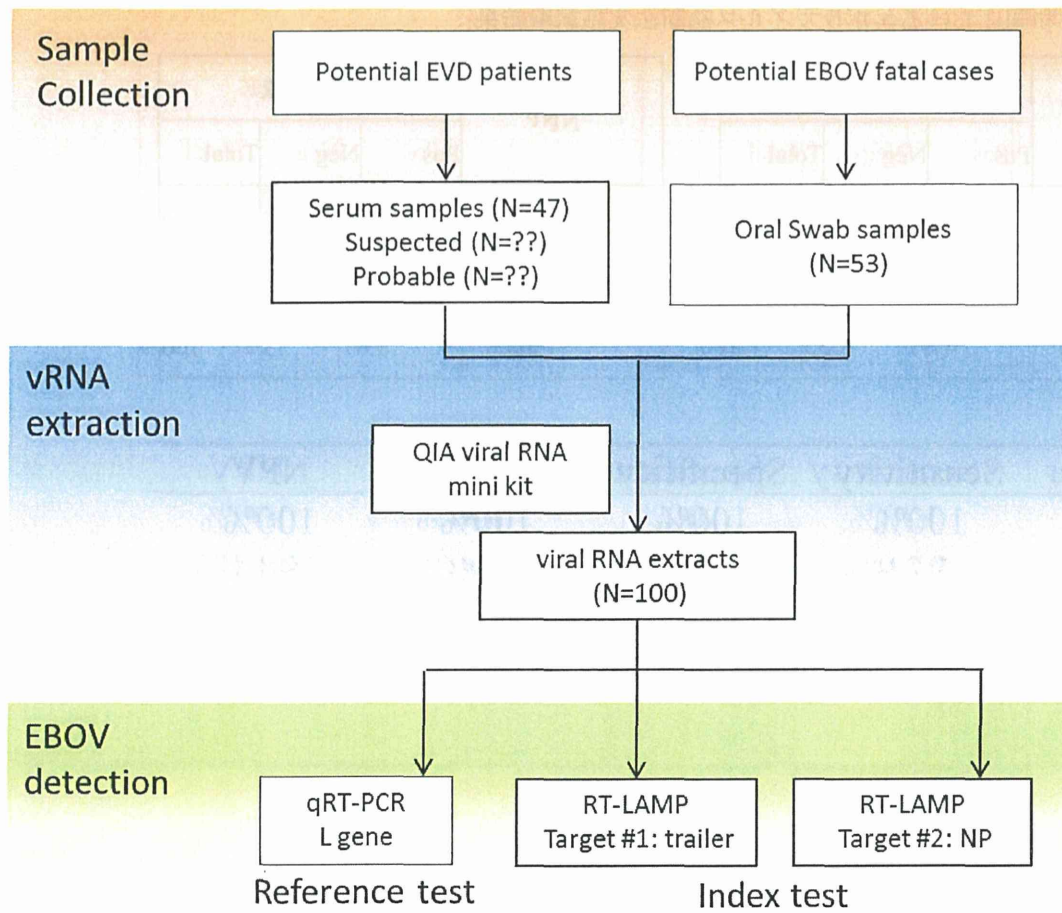


図1、ギニア共和国におけるエボラウイルス診断法実証試験実施内容フローチャート