

氏名	伊藤 聡
所属	危機分析・対応室
学年	3 年
出張先	ザンビア共和国 実験場所：ザンビア大学獣医学部
出張期間	2019 年 3 月 3 日－3 月 12 日
目的	ザンビア豚血清を用いた ELISA 検出系検出感度の確認

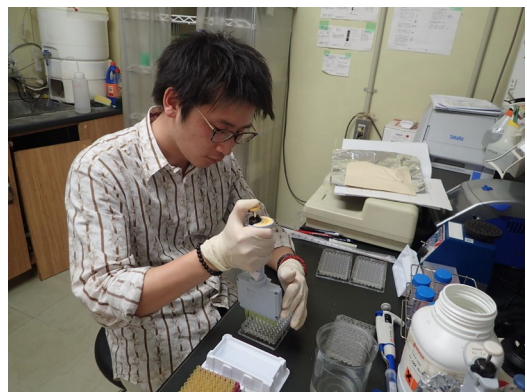
活動内容 (2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい)

アフリカ豚コレラはアフリカ豚コレラウイルスによって引き起こされる豚に特異的な甚急性の感染症であり、伝播力の高さと環境抵抗性の高さから、一度感染が拡大すれば経済的損失は非常に大きいと考えられている。これまでに有効なワクチン・治療法は開発されていないことから、本疾病の早期発見が疾病のコントロールに非常に重要だと考えられている。本疾病の早期発見には、抗原検出によるモニタリングが有用であるが、一部で不顕性感染も報告されていることから、抗体検出によるモニタリングについても注目されている。しかし、本ウイルスに対する検出キットが市販化されている一方で、発展途上国における持続可能な検査方法の確立という点ではこれらを用いての大規模血清疫学調査の実施は現実的ではない。本研究室ではこの問題を解決するために独自の ELISA 検出系の確立に取り組んでいる。具体的には、大腸菌蛋白発現系を用いたアフリカ豚コレラウイルス(ASFV) p30 抗原蛋白質の発現に成功した。そこで本演習では、本蛋白質を抗原とした ELISA 検出系の有用性を確認するために、ザンビア大学で保管されている市販の検出キット診断済みの豚血清を用いて検出感度の比較を行った。

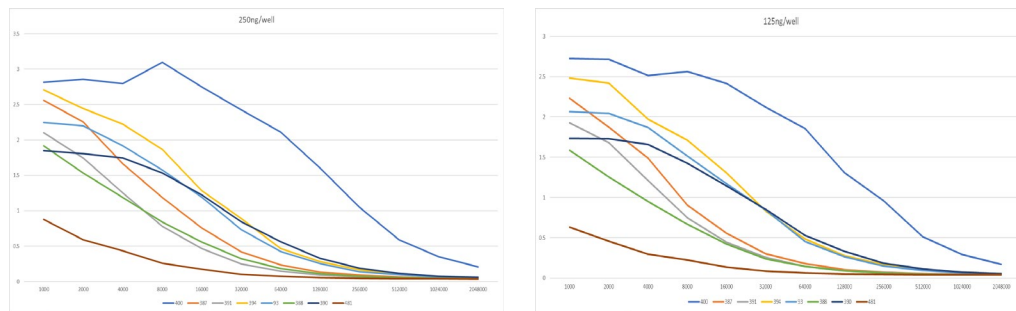
はじめに、現在確立を試みている ELISA の条件設定を実施した。日本出国前に予備実験を行った。昨夏に精製 ASFV p30 タンパクをミニブタに接種し得られた抗 p30 抗体陽性血清(WB にて確認済み)を用いて ELISA の条件設定を行った。ザンビア到着後は同様の条件にて、市販検出キット判定済みの豚血清をサンプルとして感度の確認を実施した。

陽性血清としてサンプル番号 400, 387, 391, 394 を用い、陰性血清として 93, 388, 390, 481

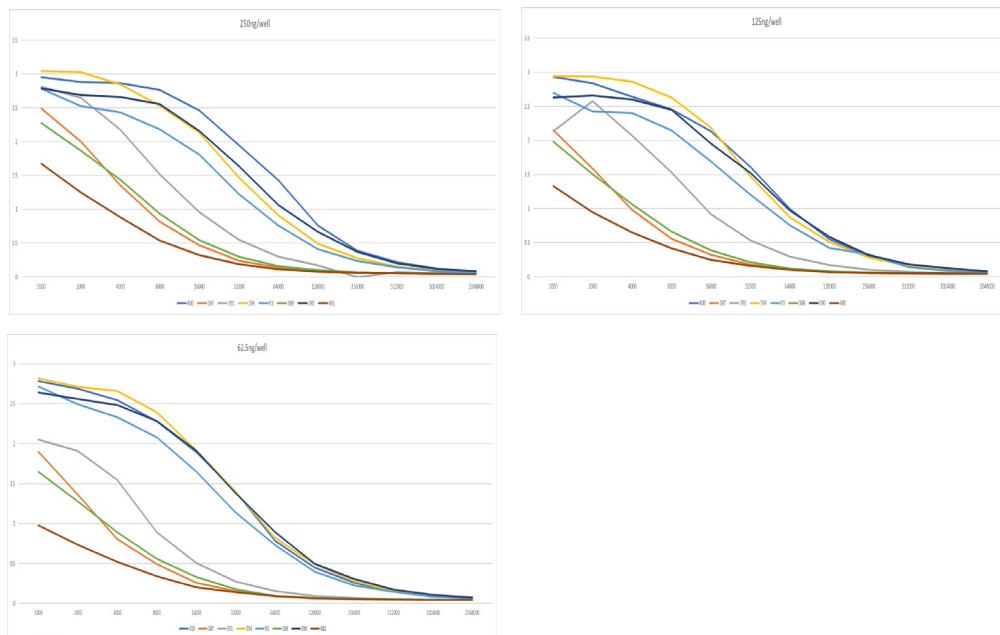
を用いた。抗原蛋白濃度を 250, 125ng/well とし、血清希釈倍率を 1000 倍希釈から



2048000 倍希釈まで階段希釈した。

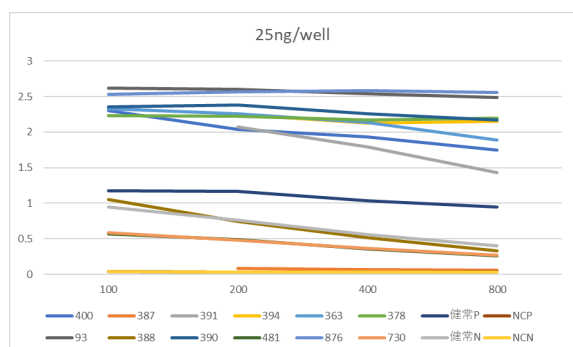
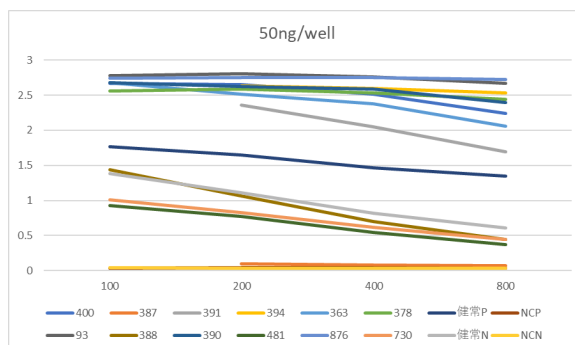
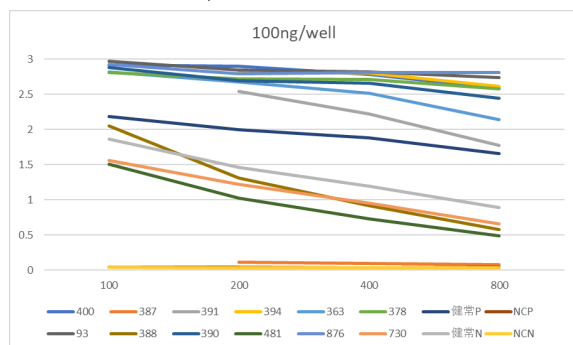


実験の結果、陽性血清と陰性血清のサンプルで明瞭なカットオフ値が定められなかった。そこで、再度条件を変更して同様の実験を行った。これまで一次抗体を 4℃オーバーナイト、ブロッキングを室温 2 時間という条件で行っていた。しかしながら、本結果を引き起こした原因として非特異的反応による OD 値の上昇が疑われたため、一次抗体を室温 2 時間、ブロッキングを 4℃オーバーナイトという条件に変更して同様のサンプルを用いた実験を再度行った。更に抗原蛋白濃度 62.5ng/well も追加した。

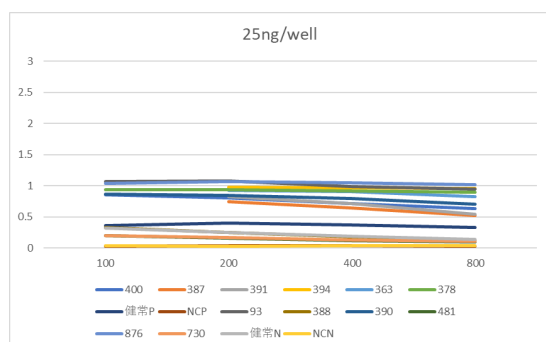
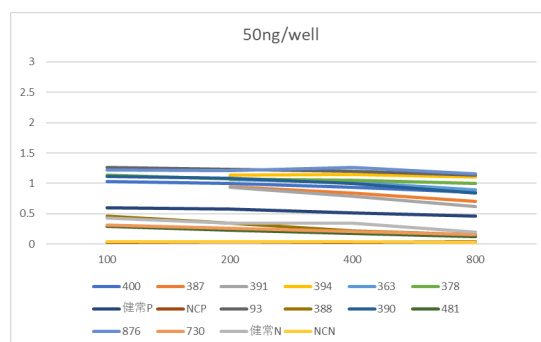
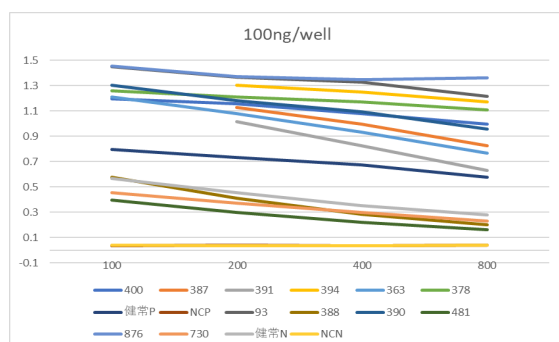


今回も前回同様陽性血清と陰性血清のサンプルで明瞭なカットオフ値が定められなかった。その一方で抗原蛋白濃度 62.5ng/well のウェルにおいて、全てではないが陽性サンプルと陰性サンプルが分かれる結果となった。そこで次の方法として、抗原蛋白濃度 100, 50, 25ng/well を用意した。その他の条件として一次抗体を 4℃オーバーナイト、ブロッキング室温 2 時間とし、二次抗体の希釈倍率をこれまで通りの 15,000 倍希釈と更に 4 倍薄い 60,000 倍希釈を準備した。なお、一次血清の希釈倍率は 100-800 倍に変更した。

二次抗体：15,000 倍希釈



二次抗体：60,000 倍希釈



これらの結果を踏まえた話し合いの末、一次抗体オーバーナイト、ブロッキング室温 2 時間、二次抗体の希釈倍率 15,000 倍を用いて ELISA 実験を行うことにした。抗原蛋白濃度に関しては 100, 25ng/well を用い、血清希釈倍率に関しては 100-800 倍希

釈を用いた。陽性血清 65 サンプル、陰性血清 65 サンプルを用いて実験を行った。結果に関しては現在解析中である。

ザンビア滞在中は大半の時間を上記の ELISA 実験に費やした。その一方でザンビア大学にてアフリカ豚コレラの研究に携わる Dr. Edgar の話を伺う機会も得た。ザンビアではアフリカ豚コレラの発生が依然として大きな問題となっており、本研究の必要性を再認識することができた。アフリカ諸国だけでなく、昨夏よりアジア地域での発生が確認されて以来、本疾病は拡大する一方である。本演習における成果は現在解析中であるが、本研究の重要性を改めて確認した演習であった。



(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 指導教員評

指導教員所属・職・氏名	危機分析・対応室 特任准教授 磯田 典和 印
実施内容について講評を記述して下さい 伊藤君はザンビア大学の北大ザンビア拠点にて、自作のアフリカ豚コレラウイルスカプシドタンパクを用いた野外血清の抗体価の測定を実施している。アフリカ豚コレラが日本ではまだ未発生の疾病のため、日本国内でできる実験は限られている一方で、周到に準備してザンビアでの野外サンプルを用いた解析の効果を高めようとしていることは評価したい。	

※1 本報告書はリーディングプログラム運営委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG で UPLOAD

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp