

帰国後 2 週間以内に提出してください (厳守) A4 用紙 4 枚以内 下記項目は変更しないでください。

(海外・国内) インターンシップ報告書

2020 年 4 月 24 日提出

氏名	齋藤 健
所属	人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門
学年	博士課程 4 年
活動先名	ザンビア大学獣医学部他、ザンビア共和国 (ルサカ)
期間	
① (出発日—帰札日)	① 2019 年 09 月 24 日-10 月 21 日
② (インターンシップ 実施開始日—終了日)	② 2019 年 09 月 25 日-10 月 20 日

・経緯

申請者はアメリカ合衆国の National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIH) にて BSL4 施設における研究に携ることを目的としたインターンシップを計画していた。目的としては BSL4 施設下において高病原性ウイルス研究がどのように運営され実施されているのかを学ぶためである。申請者は将来のキャリアパスとして、BSL4 施設で高病原性ウイルスを扱う研究に携わる研究者を目指しているからである。インターンシップ先の選定理由としては、最先端のエボラウイルス研究が行われているラボであること、大学院の先輩である古山若呼研究員がおり、インターンシップ活動のサポートが受けられることが挙げられる。インターンシップに向けては 2020 年 1 月下旬から準備を始めた。具体的には NIH の Rocky Mountain Laboratories の Dr. Andrea 並びに Dr. Heinz にコンタクトを取り、Dr. Andrea のラボで BSL4 施設運用や BSL4 施設下での実験がどのように行われているのかを学びたい旨を伝えた。1 月下旬には CV を NIH へ送り、5 月初旬から 7 月下旬までの間でインターンシップを行うことの了解を得ていた。3 月の中旬にはその他の受け入れ手続きに必要な書類の準備に取り掛かっていた。しかし、国内外における新型コロナウイルスの蔓延を鑑み、インターンシップを中止して欲しい旨、Dr. Andrea から 3 月中旬に連絡があった。以上の理由により、大学院 3 年次に実施したザンビア共和国における海外疫学調査活動を海外インターンシップとして申請することとなった。

・活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

海外にて野生動物を対象とした疫学調査を実施し、その実際を学び経験を得ることを目的とする。申請者自身が研究を行うことはキャリアパスとして疫学調査も実施する研究者を目指すのかどうかの指標にもなると考える。また海外での研究活動が日本とどのように違うのかを体験し国際感覚の素養を身に付ける。英語を利用したコミュニケーションを適切に行うことができるのかもこの活動を通じて計りたい。本インターンシップではザンビア共和国に

において、野生コウモリからのサンプリングを実施しその解析を行う。コウモリとフィロウィルスターゲットとした疫学調査は申請者所属の研究室とザンビア大学獣医学が長期に渡り継続して共同で実施しており、疫学調査を肌で感じ、共同研究先との関係を構築・維持するためには何が大切なのかを学ぶうえで最適であると考えたことがインターンシップ先として選択した理由である。

・ 活動内容 ・ 成果

1) コウモリから採取したスワブサンプルを用いたフィロウィルス遺伝子の検出

フィロウィルス属に属するエボラウィルスおよびマールブルグウィルス (MARV) は人に致死率の高い出血熱を引き起こすことが知られている。フィロウィルス感染症対策を考えるうえで、その疫学的分布を調査することは非常に重要である。今回サンプリングを実施したザンビア国においてはこれらのウィルスのヒトへの感染は報告がなく非発生国であるといえるが、非発生国におけるフィロウィルスの疫学調査は世界規模のフィロウィルス対策を考える上で重要であり、サンプリング及びその解析を実施した。今回は、2019年9月27日及び10月11日にザンビア国 Lusaka から北に 20 km程度にある SueSueman village においてコウモリを捕獲、口腔と結腸からスワブサンプルを採取した。9月27日のサンプリングでは Sample No. 51-113 の 63 サンプルを、10月11日のサンプリングでは Sample No. 115-147 の 33 サンプルを採取した。



SueSueman village の洞窟



コウモリ捕獲用ハーPtrap



Trapにて捕獲したコウモリ



口腔スワブ採材の様子

写真のように、コウモリ捕獲のために洞窟入り口に捕獲用のトラップを仕掛けることで捕獲した。捕獲したコウモリから口腔・結腸スワブサンプルと血液を採材した。採取したサンプルから QIAGEN Viral RNA purification kit を用いてウイルス RNA を精製し、以下の解析に供した。

(1-1) フィロウイルス NP 遺伝子検出のための RT-PCR およびシーケンス

(1-2) MARV-NP 遺伝子検出のための RT-PCR およびシーケンス

(1-3) MARV-VP35 遺伝子検出のために RT-PCR およびシーケンス

フィロウイルスの遺伝子を検出するために、各種特異的プライマーを用いて RT-PCR を実施し、増幅産物のバンドパターンを電気泳動で確認した。陽性であったサンプルに対してシーケンスを実施、ウイルス遺伝子配列が認められるかを検証した。結果、(1-1) では1サンプルが PCR 陽性であり、(1-2) では3サンプルが PCR 陽性でありそのうちの2サンプルでは Marburg marburgvirus R. aegyptiacus/Zambia/2018/ZB18-36 NP gene の配列の一部と 100%一致する遺伝子配列が得られた。(1-3) では PCR 陽性であったのは1サンプルであり、このサンプルでも Marburg marburgvirus R. aegyptiacus/Zambia/2018/ZB18-36 VP35 gene の配列の一部と 100%一致する遺伝子配列が認められた。

2) コウモリから採取したスワブサンプルを用いたマーマアレナウイルス遺伝子の検出

マーマアレナウイルス属は旧世界アレナウイルスおよび新世界アレナウイルスに分類される。旧世界アレナウイルスには重篤な出血熱性疾患を引き起こすラッサウイルスやザンビアで 2009 年に出血熱性疾患を呈した患者から分離されたルジョウイルスが含まれている。ルジョウイルスの自然宿主およびその分布域はわかっていない。アフリカに分布するコウモリをターゲットとしたアレナウイルスの疫学調査は現在まで行われたことがなく、ルジョウイルスの自然宿主がわかっていないことなどを考えると非常に重要であり、今回コウモリサンプルからのアレナウイルス遺伝子の検出を試みた。サンプルはフィロウイルス遺伝子検出に用いた SueSuman village にてサンプリングを行ったコウモリ由来のサンプルを用いた。スワブサンプルからウイルス RNA を抽出した後、One step RT-PCR 法を用いて以下のマーマアレナウイルス遺伝子の検出を試みた。

(2-1) 旧世界アレナウイルス L 遺伝子検出のための RT-PCR およびシーケンス

(2-2) 新世界アレナウイルス NP 遺伝子検出のための RT-PCR およびシーケンス

結果、(2-1) では7サンプルが、(2-2) では4サンプルが PCR でバンドが認められたが、時間の都合上シーケンスによる解析には至らなかった。いずれもサンプル中に本当にアレナウイルス遺伝子が含まれているかどうかは不明であり、シーケンスを行うことが必要である。

・今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか。

申請者は研究者として国内外の大学機関、研究機関においてヒトに高致死率の病気を引き起こすウイルスに関する研究に携ることを将来の進路として考えている。このようなキャリアパスを

考えるうえで、申請者に特にプラスになった点を挙げる。まず実験室内のラボワークに限らず疫学調査といったフィールドワークも実施可能な研究者を目指したいと本インターンシップを通じて考えるようになった。申請者の主な研究対象はルジヨウウイルスである。ルジヨウウイルスが発生したザンビアにいき、その空気を肌で感じた。ザンビア大学の研究者はルジヨウウイルスに対して関心が高く、自然宿主の同定を目指したいと考えていた。申請者が行っている研究は直接自然宿主の同定につながるものではない。しかし研究内容に関して彼らとディスカッションし私自身の研究も重要だと言ってもらえたことは本当に励みになっている。加えて彼らの意識の高さに触れることで、実験室内で行っている研究ももちろん重要ではあるが、現地での感染症対策を考えるうえではラボワークとフィールドワークの両方が必要であることを再確認させられた。片方に特化した研究者というよりは両輪を有した研究者を目指す決意がついたインターンシップであった。次にプラスになったことは、疫学調査を行ううえではコラボレーション先との良好な関係構築がポイントであることを学んだことである。滞在中に印象的だったことには、ザンビア大学の先生方やスタッフと梶原助教との関係性がとても良かったことがある。梶原助教はザンビア大学の方からとても頼りにされており、彼自身も彼らに真摯に対応しており、日本と途上国の研究者であっても互いにリスペクトを持って接している姿に感動さえ覚えた。長年の共同研究を支えているのはヒトとヒトとの繋がりであり信頼関係であることを改めて気付かされたことはとても大きなことだったと思う。私自身もコラボレーション先とともに疫学調査を行う研究者になった際には梶原助教のように最大限のリスペクトを持って接し、お互いのことを考えた共同研究を実施できる人間味溢れる研究者になりたいと感じた。また本インターンシップでは丁寧に実験を行うことが良い結果を得るためには必要であるということも学んだ機会もあった。具体的には PCR を行う際のコンタミネーションを防止するためにはピペットマンやチップ、チューブを丁寧に扱うという基本がとても重要であるということであった。私が PCR をかける際にポジティブコントロールのコンタミネーションを起こしてしまったことがあり、この基本的な操作の重要性に立ち返った。ある意味慢心していた私にショックを与えたコンタミネーション事件は丁寧に実験をする、という本当に当たり前のことを振り返らせてくれたものであり、研究者としての実験を行う心構えを再確認させてくれたものであった。最後に今回ザンビアにてサンプリングおよび解析を行うにあたって協力していただいたザンビア拠点の邱永晋博士、当研究室の梶原将大助教、SATREPSの中元則晶業務調整員、岡山大学の小川寛人助教、同伴し指導していただいた高田教授および協力および支援していただいた全ての方々に深謝したい。

・後輩へのアドバイス

研究を行ううえで疫学調査に参加できる機会があるのであれば積極的に参加するべきだと思える。特に海外におけるフィールドワークにおいては大変なことも含めて非常に良い経験になると思う。対象は可能であれば自身がターゲットしている研究対象の病原体等が最適なのではないだろうか。また現地の研究者ともコミュニケーションを積極的に行うことは自身の研究について再度深く考える機会になるだろう。

指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 人獣共通感染症リサーチセンター・国際疫学部門・教授 高田 礼人
---------	---

- ※1 電子媒体を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。
- ※3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス支援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

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