

(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 報告書

H25 年 3 月 27 日提出

氏名	森脇 潤
所属	野生動物学教室
学年	博士課程 2 年
出張先	ネパール連邦民主共和国 カトマンズ結核研究所及びチトワン国立公園
出張期間	平成 25 年 1 月 21 日から平成 25 年 2 月 13 日
目的	➤ カトマンズ結核研究所での会議の出席 ➤ チトワン国立公園での飼育下ゾウの結核診断のためのサンプリング、抗体検査の実施

【出張の目的】

結核症は、主に *Mycobacterium tuberculosis* により引き起こされる再興人獣共通感染症である。近年、ゾウにおける結核症が問題となって以来、人における感染性が危惧されているが、その詳細は明らかではない。ネパールは、インドとチベットの間の山間部に位置する人口およそ 3000 万の小さな国である。ネパールは、ヒトの結核症の制御を行なっている途上の国である。一方、南アジアの地方病として家畜の結核症も存在する。家畜の結核症は *Mycobacterium bovis* であり、ヒトの *Mycobacterium tuberculosis* とはわずかに異なった細菌である。しかしながら、人々は *M. bovis* にも感受性があり、感染動物との接触や、汚染し、加熱が不十分な肉や、未滅菌の乳を飲むことにより感染する。

本調査では、捕獲飼育したゾウの結核症の存在様式を明らかにし、ゾウにおける結核症を制御する戦略を開発するための疫学調査に同行した。

【実地内容】

現地での取り組みは 2013 年 1 月 22 日から 2 月 12 日まで行われた。

結核研究所での会議

2012 年 1 月 22 日、坪田教授、Sarad Paudel および森脇同行のもと、同研究所スタッフ Dr. Bhawana Shrestha 氏と Mr. Bhagwan Maharian 氏とを交えて話し合いが行われた。疫学調査の趣旨について説明が行われ、同研究所の設備を分離培養および抽出目的で使用するについて了承が得られた (Fig. 1)。

森林・土壌保全省 国立公園および野生生物保護部門での会議

同日、森林・土壌保全省国立公園および野生生物保護部門において、日本からの 3 名と、同省の生態学者 Dr. Maheshwar Dhakal 氏および上席獣医官の Dr. Kamal Prasad Gaire 氏を交えて話し合いが行われた。疫学調査についての理解が得られ、

フィールド調査における全面的なバックアップを受ける事になった (Fig. 2)。Dr. Dhakal 氏は、筑波大学に留学経験があり、日本語が堪能であった。



Fig. 1. 結核研究所にて(左から坪田教授、Mr. Bhagwan Maharian 氏、Dr. Bhawana Shrestha 氏および Sarad Paudel)



Fig. 2. 森林・土壌保全省 国立公園および野生生物保護部門での会議(左から1番目: Dr Kamal Prasad Gaire 氏、左から3番目: Dr. Maheshwar Dhakal 氏)

チトワン国立公園における会議とフィールド調査(Fig. 4)

翌1月23日、Elephant Care International(ESI)所長の Dr. Susan Mikota DVM 氏(Fig. 5)とともに、チトワン国立公園に向かった。Dr. Mikota 氏はゾウの結核症研究の第一人者であり、当時チトワン国立公園で獣医師であった Sarad Paudel らと結核の疫学調査に取り組まれていた。今回は、調査日程を調整して、我々の疫学調査と同時期にチトワン国立公園に向かう計画をしていた。チトワン国立公園に向かう車中で、将来行われるゾウの結核症研究について、共同研究者かつ、論文作成上の共著者となる承諾が得られた。Dr. Mikota 氏には、チトワン国立公園を離れるまで調査の指揮を取っていただいた。

その後数日間、疫学調査の趣旨の理解と協力を求めるため、生物多様性保全センター主任、ゾウの個人所有者、チトワン国立公園内のゾウ飼育施設の主任のいる各施設を訪問した。

野外でのサンプリング調査は、1月25日から翌2月8日にかけて行われた。調査は2部構成で行われ、前半は、分離培養を行う個体の選別、潜在的な個体の摘発を目的に抗体検査のための採血、栄養状態を評価するための体重測定・ボディーコンディションについての記録を行った(Fig. 6-11)。その翌日には、採血した個体の血清を用いて DPP VetTB Assay を用いて抗体検査を行った(Fig. 12)。サンプリングは、Chitwan national park (CNP)、Parsa Wildlife Reserve (PWR)および Koshi Tappu Wildlife Reserve (KTWR)で行われた(Fig. 3)。場所は、後半は、抗体検査陽性の中でも結核症特異的な反応を示した個体のみ Trunk discharge すなわち鼻汁の採材を行った(Fig. 13)。採材した試料は精製・培養まで -30°C で冷凍保存した。

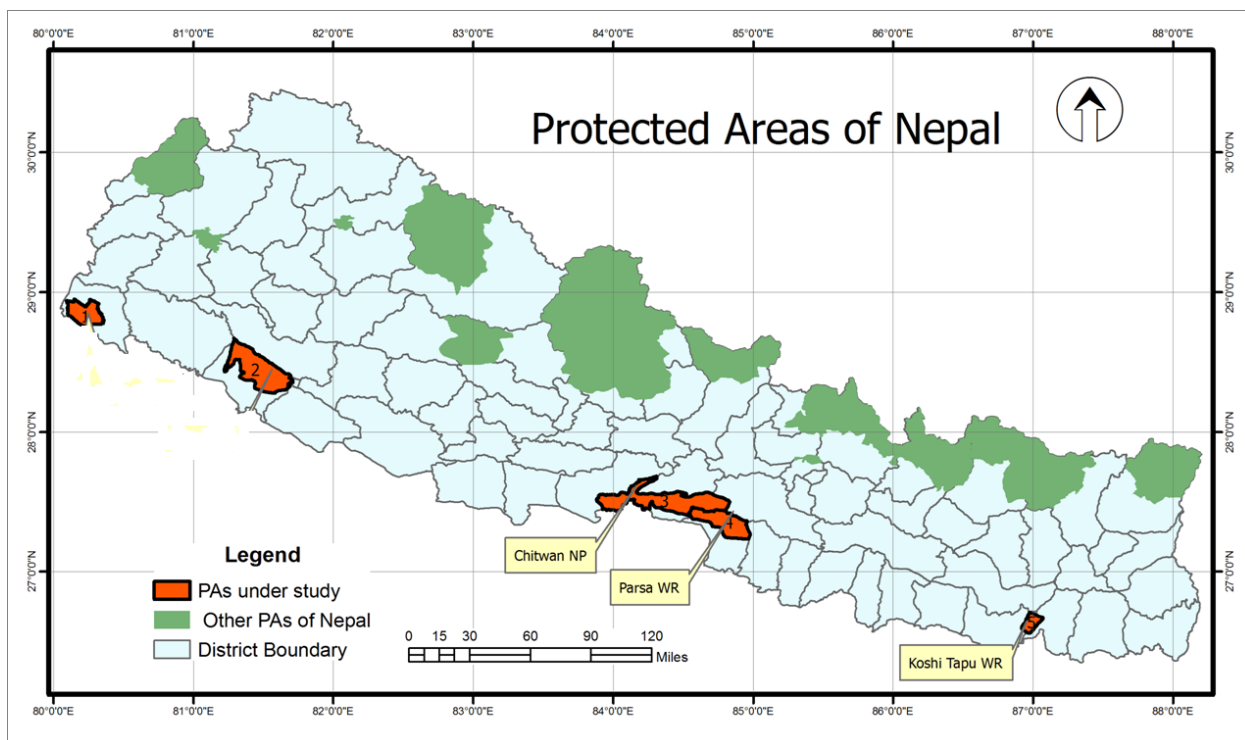


Fig. 3 ネパール国内の国立公園を示す地図



Fig. 4 チトワン国立公園の看板と筆者



Fig. 5 チトワン国立公園での会議(左から 2 番目が Dr. Mikota 氏)



Fig. 6 ズウの体重測定



Fig. 7 ズウの採血(耳介から)



Fig. 8 ゾウの胸囲の測定



Fig. 9 ゾウの口腔内検査



Fig. 10 ゾウの足底(アジアゾウは凹凸があるのが正常)



Fig. 11 ゾウの体温(ファーレンهایت度、平熱)



Fig. 12 抗体検査(左: 試薬を滴下しているところ、右: 蛍光光度を読み取っているところ)



Fig. 13 ゾウの Trunk wash(鼻汁)採材

結核研究所(Fig. 14) における精製、培養

2月10日には、カトマンズ市内へ移動し、結核研究所において、凍結した鼻汁の精製・培養を行った。常温解凍した鼻汁を、50 ml 遠心チューブ内で、3000rpm 10℃、1 分間の遠心を行い、上清を再び 3000rpm、15 分間遠心し、沈渣を回収した。次に、0.50g の N アセチル L システインを水酸化ナトリウム-クエン酸ナトリウム溶液 (4%NaOH 溶液と 2.9%クエン酸ナトリウム液を 1:1 で混合したもの)100ml にメスアップした NALC/NaOH クエン酸ナトリウム溶液を沈渣と当量加え、 20 ± 5 秒間ボルテックスした。15 $\pm$ 5 分間 NALC と接触させた後、遠心管に PBS を十分量加えた。同溶液は 6000rpm、10℃、20 分間遠心した。上清を捨て、沈渣を 1ml PBS を加えて再懸濁させ、 20 ± 5 秒ボルテックスした。試料を培養用いた。培養は L-J 斜面培地 (Fig. 15, 16) およびピルビン酸添加斜面培地に接種した。



Fig. 14 カトマンズ市内の結核研究所(外観)



Fig. 15 鼻汁の塗抹をする Sarad Paudel



Fig. 16 左: L-J 培地、中: インキュベータ、右: 作業の途中で停電になることもある

【本疫学調査のインパクトおよび今後の展望】

ネパールにおけるゾウの結核症の疫学調査は 2002 年より継続して行われているが、2012 年は、147 頭のゾウに抗体検査を行ったところ、25 %が新規陽性であった (Table 1, Fig. 17)。以前の陽性を含めると 34 %にのぼる。既に陽性であった個体には隔離と投薬治療が行われているが、ゾウの所有者の経済的な問題から適切な治療が行われていない例も存在する。今後は、遺伝子解析を行い、伝播経路の推定を行う予定である。

陽性であったもののうち、DPPVet TB Assay によって強く陽性であった 9 頭の鼻汁を回収し、現在培養検査中である。培養の最終結果は 8 週間後である。

Table 1 調査地区別結核抗体検査結果

調査地区	新規陽性個体数	継続陽性個体数 (治療/未処置)	陰性個体数	合計
CNP	31	11	91	133
PWR	5	1	5	11
KTWR	1	1	1	3
合計	37	13	97	147

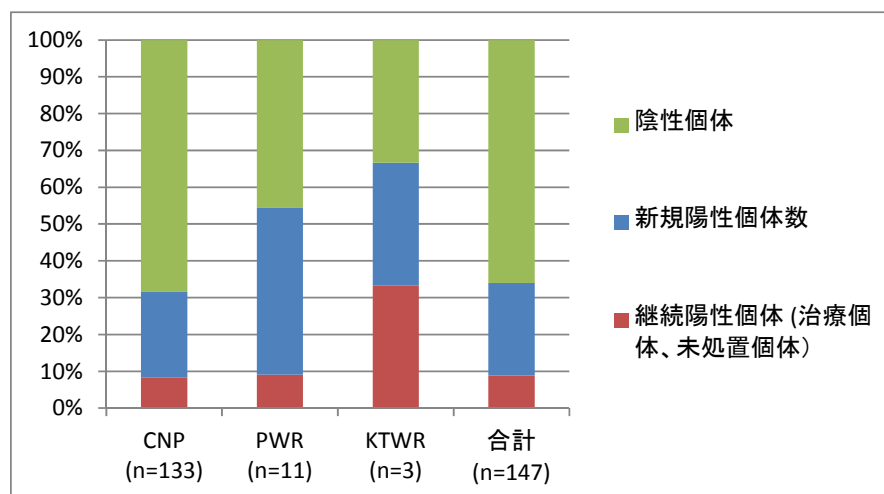


Fig. 17 調査地区別抗体検査結果

【最後に】

ネパールの疫学調査に同行し、疫学のみならず、国の文化、言語、社会的な交流を通して有意義な出張でした。特に、喧騒な道路事情、道端を走り回る鶏、ヤギおよび牛、降り注ぐチリ、停電。日本がいかに恵まれているかを知る一方、友人・知人そして親戚のつながりを大事にするネパールの人々の関係から日本の古き良き時代を見てきたような気がしました。本疫学調査に同行するにあたって、長期の不在を許していただいた野生動物学教室 坪田教授、下鶴助教。また、このような貴重な経験をさせてくれた Sarad Paudel。このような機会を与えていただいた、リーディングのスタッフのみなさまお世話になりました。この場を借りて心から感謝申し上げます。