

(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 報告書

2014 年 6 月 16 日提出

氏名	丸山 隼輝
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 2 年
出張先	ザンビア大学、ンドラ市内およびカサンカ国立公園
出張期間	12 月 1 日～22 日
目的	ザンビアにおけるコウモリのフィロウイルスおよびインフルエンザウイルス保有状況の調査

Ebola virus および Marburg virus が属するフィロウイルスは人を含む霊長動物に重篤な出血熱を引き起こし、その高い病原性からバイオセーフティレベル (BSL) 4 での取り扱いが求められる病原体である。フィロウイルス感染症は輸入動物や旅行者の発症を除くと、サハラ砂漠のアフリカ諸国とフィリピンでのみ発生しているが、その詳しい感染経路や自然宿主についての知見は豊富ではない。そこで現地での疫学調査がフィロウイルスの分布域および自然宿主の解明には不可欠である。そこで私は北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際疫学部門の高田教授、吉田助教、博士課程 2 年の直、分子病態部門の木村准教授、中村講および国立感染症研究所のウイルス第 1 部部長・西條先生と共にザンビアに入国し、自然宿主と考えられているフルーツコウモリからサンプルを採取し、抗体調査のための血清分離、臓器乳剤からの遺伝子検出およびウイルス分離を試みた。また近年報告された新規のフィロウイルスである Lloviu virus (LLOV) に対する抗体調査および遺伝子検出、さらに最近、南米のコウモリから検出された H17 および H18 インフルエンザウイルスの遺伝子検出も試みた。



図 1. 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターザンビア拠点の様子

ンドラ市内およびカサンカ国立公園ではフルーツコウモリ的一种である *Eidolon helvum* 計 111 個体を捕獲し、体重および体長の測定および全採血を行った。捕獲し

た個体および血液はザンビア大学に持ち帰り、個体からは各種臓器（脳、唾液腺、肺、肝臓、脾臓、結腸）を採材し、臓器乳剤を作成した。作成した臓器乳剤は VeroE6 および ZFBK11-97 細胞に接種しウイルス分離を試みた他、RNA を抽出し RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出を試みた。PCR プライマーはフィロウイルス検出用の FiloNP (Ogawa et al, J Virol Methods, 2011) の他、日本国内で設計しザンビアに持ち込んだ LLOV 検出用の LLOV NP、インフルエンザウイルス検出用の IFN PB1 および IFN M を用いた。臓器乳剤の作成およびその細胞への接種は北海道大学ザンビア拠点内の BSL3 施設で行った。また、持ち帰った血液から血清分離を行い、日本へと持ち帰った後に ELISA による抗体調査を行った。さらにザンビア拠点の小川助教と共に持ち帰ったコウモリから細胞株の樹立を試みた。細胞株の樹立は成体の肺、腎臓、肝臓、脾臓および胎仔の線維芽細胞、腎臓を摘出し、MEM 培地に播種した後に SV40 の T 抗原を導入・発現することで行った。

標的遺伝子	プライマー名	配列
Lloviu virus NP	LLOV NP-195F	CCTGCAGGATGTTGCTGATA
	LLOV NP-450R	AAACATCCCAGCCGTAGTTG
Influenza virus PB1	Pan fluA PB1 130F	CCiCCiTACAGyCATGGrAC
	Pan fluA PB1 1267R	AACATiCCCATCATCATnCC
Influenza virus M	Pan fluA M 52F	ATGAGyCTtctTrACiGAGGTyGAAACG
	Pan fluA M 728R	TGGTArGCCTGyArATTkTCAAG

表 1. 日本国内で設計しザンビアに持ち込んだプライマー



図 2. フルーツコウモリ *Eidolon helvum* と採血の様子

Vero E6 および ZFBK11-97 細胞に接種し、盲継代を行った全ての臓器乳剤サンプルはこれら 2 つの細胞株に対して細胞変性効果 (CPE) を起こさなかった。また抽出した RNA を鋳型とした RT-PCR は FiloNP、LLOV NP、IFN PB1 および IFN M の

全てのプライマーセットで特異的な遺伝子増幅産物は得られなかった。フィロウィルスの表面糖タンパク質 GP に対する ELISA の結果、エボラウイルスおよびマールブルグウイルスに対して抗体陽性となるサンプルが複数存在した。ELISA の結果は 2006 年から 2013 年までに集めた当研究室の血清学的疫学調査の結果として発表する予定である。成体の腎臓、脾臓、胎仔の先生および腎臓からの細胞株の樹立に成功した。これら樹立された細胞株は、ザンビアにて小川助教により継代を重ねられ日本に持ち帰られた。これらは *Eidolon helvum* から樹立された初めての細胞株であり、今後当研究室にて実験に用いられる予定である。

今回捕獲されたコウモリのうち複数はフィロウィルスの GP に対する抗体を保有していると考えられ感染歴が有ることが疑われるが、ウイルス分離および遺伝子の検出には成功しなかった。今後はサンプリングの次期を変えて更なる調査を行う必要があると考えられる。また今回、試験的にコウモリインフルエンザウイルスの検出を試みた。新規に見つかったコウモリインフルエンザウイルスは新大陸にのみ生息するコウモリから検出されたものであり (Tong et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012)、アフリカ大陸に生息するコウモリが保有しているか否かは定かではない。今後は抗原を作出し ELISA による抗体検出を試みる予定である。

最後に今回ザンビアにてサンプリングおよび実験を行うにあたって協力していただいたザンビア拠点の小川助教、当研究室の卒業生である梶原博士、同伴し指導していただいた高田教授、吉田助教およびリーディングプログラムオフィスを始めとした全ての協力および支援していただいた方々に謝辞を表したい。

(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	国際疫学部門・教授・高田 礼人	印
実施内容について講評を記述して下さい		
今回の演習では、ザンビアの食果コウモリにおけるフィロウィルスの保有調査を中心に、ザンビア大学のスタッフと共同で疫学調査を実施した。丸山隼輝君は彼の博士課程のテーマであるフィロウィルスの研究のみならず、当研究室の直亨則君と協力し、近年新たに見つかったコウモリインフルエンザウイルスの遺伝子検出を試みるなど、様々な活動に意欲的に参加した。また、ザンビア大学のスタッフとも積極的に意思疎通を図り、実験を効率的に進めていった。今回の演習が、途上国の実情を体験するとともに、目的を同じくする研究活動を現地のスタッフと共に実施する事で、One World・One Health の概念をより深く理解・実践するための一助となることを期待する。		

※ 1 電子媒体を e-mail で国際連携支援室・リーディング大学院担当に提出するとともに、指導教員が押印した原本を国際連携支援室・リーディング大学院担当に提出して下さい。

北海道大学
博士課程教育リーディングプログラム
「One Health に貢献する獣医科学グローバルリーダー育成プログラム」

※2 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：国際連携推進室・リーディング大学院担当

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