

(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 報告書

2014 年 06 月 20 日提出

氏名	直 亨則
所属	人獣共通感染症リサーチセンター
学年	博士課程 2 年
出張先	ザンビア共和国
出張期間	2013/12/01-2013/12/22
目的	ザンビア共和国におけるフィロウイルス及びインフルエンザウイルスの疫学調査

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)

【背景と目的】

【インフルエンザウイルス】

オルソミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスは野生水禽を自然宿主とし、ヒトを含む様々な動物種（ニワトリ、豚、馬等）に感染する。インフルエンザウイルスはウイルス粒子表面にヘマグルチニン（HA）及びノイラミニダーゼ（NA）の二種類の表面糖タンパクを有し、これらの表面糖タンパクはその抗原性によって HA が 16 種類の亜型（H1～H16）に NA が 9 種類の亜型（N1～N9）に分けられている。これらの亜型に加えて、近年新しい亜型のインフルエンザウイルス（H17N10 及び H18N11）が南アメリカ大陸のコウモリから検出された。今回の疫学調査ではアフリカ大陸に位置するザンビア共和国のコウモリのインフルエンザウイルスの保有状況を調査することを目的としている。

【フィロウイルス】

マールブルグウイルス属、及びエボラウイルス属はフィロウイルス科に属し、人を含む霊長類に致死的な出血熱を引き起こすが、その自然宿主や自然界での生活環境については不明な点が多い。また人や霊長類への病原性は不明であるが、近年ヨーロッパでフィロウイルス科に属する新しいウイルス（Lloviu cuevavirus）がコウモリから検出されている。今回の疫学調査ではフィロウイルスの自然宿主であると考えられているコウモリのサンプリングをザンビア共和国で行う（ザンビア共和国ではフィロウイルスは見つかっていないが、同国と国境を接するアンゴラやコンゴ民主共和国ではフィロウイルスによる出血熱のアウトブレイクが発生しており、ザンビア共和国にもフィロウイルスが存在すると考えている）。

【方法】

【コウモリの捕獲及び解剖】

我々はザンビア共和国のンドラ（首都ルサカに続くザンビアで 2 番目に大きな都市）、カサンカ国立公園及びザンビア大学でコウモリを捕獲した（ンドラでは民家の庭で散弾銃を、カサンカ国立公園ではコウモリの宿営地の森で空気銃とタモ網を、ザンビア大学ではタモ網を使用してコウモリを捕獲した）。捕獲したコウモリは *Eidolon helvum* 111 匹、*Epomophorus gambianus* 1 匹の合計 112 匹であり、コウモリは案楽殺後に体重と翼長の計測及び採血を行い、冷蔵してザンビア大学に持ち帰った。ザンビア大学では P3 施設内でコウモリを解剖し、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、腸管、羊水、及び胎児を採取した。



左：出発前の打ち合わせ 中

央：コウモリ捕獲の様子 右：捕獲後のコウモリの採血

【RT-PCR によるフィロウイルス及びインフルエンザウイルスの検出】

採取した肺、肝臓、脾臓、腸管から 10%臓器乳剤を作成し、RNA を抽出し、下記に示すプライマーを用いて RT-PCR を行った。肺、肝臓、脾臓からはフィロウイルスの、腸管からはインフルエンザウイルスの検出を試みた。

PaninfluenzaA PB1 130F	5' CCiCCiTACAGyCATGGrAC 3'
PaninfluenzaA PB1 1276R	5' AACATiCCCATCATCATnCC 3'
PaninfluenzaA M 52F	5' ATGAGyCTtTrACiGAGGTyGAAACG 3'
PnainfluenzaA M 389R	5' CCCATGCAGCakGCtAakGChCC 3'
LLOV NP-195F	5'CCTGCAGGATGTTGCTGATA 3'
LLOV NP-450R	5' AAACATCCCAGCCGTAGTTG 3'
FiloNP-Fm	5' TGGCTTACYACAGGYCACATGAAAGT 3'
FiloNP-Rm	5' GTGTGTGATTTTCAGTTTTTYTGGAGGTGGAA 3'
FiloNP-Fe	5' TGGCAATCAGTDGGACACATGATGGT 3'
FiloNP-Re	5' GAAGCTGATTTTCRTTCTTYTTCTGATGGAA 3'

＊ PaninfluenzaA PB1 130F, PaninfluenzaA PB1 1276R, PaninfluenzaA M 52F, PnainfluenzaA M 389R, LLOV NP-195F 及び LLOV NP-450R はインフルエンザウイルス及び Lloviu cuevavirus 検出のために当研究室で設計したものであり、FiloNP-Fm, FiloNP-Rm, FiloNP-Fe 及び FiloNP-Re は人獣共通感染症リサーチセンター・ザンビア拠点の小川助教が設計したものである (Ogawa et al, J Virol Methods, 2011)。

【ウイルス分離】

肝臓、脾臓から作成した 10%臓器乳剤及び羊水を Vero E6 細胞と ZFB17-11 細胞 (コウモリ由来細胞株) に接種し、盲継代を行った。

【結果】

【RT-PCR によるフィロウイルス及びインフルエンザウイルスの検出】

肺から抽出した RNA を用いて Lloviu cuevavirus の検出を、肝臓及び脾臓から抽出した RNA を用いてフィロウイルスの検出を、腸管から抽出した RNA を用いてインフルエンザウイルスの検出を試みたが、それぞれのウイルス核酸は検出できなかった。

【ウイルス分離】

サンプルを接種した全ての細胞において細胞変性効果は見られなかった。

【まとめ】

今回の疫学調査では目的としていたインフルエンザウイルス及びフィロウイルスの分離、並びに核酸の検出には成功しなかった。しかし、採取した複数のコウモリの血清からフィロウイルスの表面糖タンパクに対する抗体が検出されており、フィロウイルスに感染した既往歴があることが示唆されているため、時期や場所を検討しつつ疫学調査を続けていくことが必要であると考えられる。また、コウモリの保有するインフルエンザウイルスについてはアフリカ大陸に存在しない、もしくは保有率が低いために検出できないのか、もしくは遺伝子配列がこれまで知られているウイルスとは異なっているために検出できないのか等が不明であり、プライマー配列の改変や次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析、血清中の抗体検出等を含めて調査を続けていく必要があると感じた。

最後になりましたが、今回のザンビアでの疫学調査を行うにあたってザンビア大学、人獣共通感染症リサーチセンター、リーディングプログラムオフィスのスタッフの皆

様方に丁寧なご指導と多大なご支援を賜りましたことを感謝いたします。

（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	人獣センター 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。直亨則君の博士課程における研究テーマはインフルエンザウィルスの病原性に関するものであるが、今回の調査では近年新たに見つかったコウモリインフルエンザウィルスの遺伝子検出を試みた。残念ながらウイルスは検出されなかったが、コウモリの捕獲、解剖、野外サンプル管理など彼にとって初めての経験を通して、人獣共通感染症の疫学研究に必要な技術的要素を理解したと思われる。また、ザンビア大学のスタッフ及びザンビア拠点のスタッフと積極的にコミュニケーションを図り、順調に実験を進め、予定していた全ての実験を演習期間中に無事に終えた。今回の疫学演習を通じて発展途上国における疫学調査を経験できたことが、One World - One Health の概念を深く理解・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。
- ※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