

(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 報告書

2015 年 1 月 8 日提出

氏名	古山 若呼
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	ザンビア共和国 サンプリング：カサンカ国立公園、ンドラ市内、Suesueman village 分析場所：ザンビア大学獣医学部
出張期間	11 月 27 日～12 月 24 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致死的な出血熱を引き起こすウイルスであり、その自然宿主や自然界での生活環については不明な点が多い。そこで本演習では、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礼人教授、ザンビア拠点の小川寛人特任助教と共にザンビアに入国し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行った（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られる）。捕獲したコウモリからは臓器と血清を採取し、臓器からのウイルス遺伝子検出と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 インフルエンザウイルス** の遺伝子検出も試みた。



図 1.ザンビア大学内でのサンプリングの準備と話し合いの様子

ンドラ市内およびカサンカ国立公園では食果コウモリ的一种である *Eidolon*

helvum 計 103 個体を捕獲し、体重・体長の測定および全採血を行った。また、スースマンケープでは、食果コウモリ的一种である *Rousettus aegyptiacus* と思われる個体を 10、食虫コウモリ的一种である *Hipposideros gigas* と思われる個体を 11、そして *Miniopterus spp.*と思われる個体を 2 個体捕獲し、体重・体長の測定および全採血を行った。捕獲した個体と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、および結腸）を採材し、臓器乳剤を作成した。作成した臓器乳剤は VeroE6 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 Filo virus 検出用の FiloNP (Ogawa et al, J Virol Methods, 2011) の他、Influenza virus 検出用の InfluenzaAM また、本研究室で設計しザンビアに持ち込んだ Lloviu virus 検出用の LLOV L を用いた。持ち帰った血液からは血清分離を行った。この血清は日本へと持ち帰った後に ELISA による抗体調査を行う予定である。

標的遺伝子	プライマー名	配列
Lloviu virus L	LLOV L-1818F	CTCATGGCATCATGAACAGG
	LLOV L-2209R	TGACGGCTGATCTTGTCTTG
Filovirus NP	FiloNP-Fm	TGGCTTACYACAGGYCACATGAAAGT
	FiloNP-Rm	GTGTGTGATTTTCAGTTTTTYTGGAGGTGGAA
	FiloNP-Fe	TGGCAATCAGTDGGACACATGATGGT
	FiloNP-Re	GAAGCTGATTTTCRTTCTTYTTCTGATGGAA
Influenza A virus M	Flu A_M37F	AACMGAGGTYGAAACGTACGTTCT
	Flu A_M606R	AGCCATYTGYTCCATRGCTT

表 1.ザンビアで使用したプライマー



図 2. フルーツコウモリ *Eidolon helvum* と採血の様子、およびサンプリングメンバー

Vero E6 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 Vero E6 細胞に対して細胞変性効果を起こさなかった。また抽出した RNA を鋳型とした RT-PCR はすべ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。

今回捕獲されたコウモリからは、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時期を変えて更なる調査を行う必要があると考えられる。また前回に引き続き、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。

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り協力していただいた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、ザンビア拠点の小川助教、そして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深謝いたします。

(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	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。本人の博士課程の研究テーマであるフィロウィルスに関する研究のみならず、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。市街地および国立公園などでのサンプリング活動を通して、ザンビア大学のスタッフ、現地の人々と積極的に意思疎通を図り、海外での疫学調査に必要なノウハウを効率的に吸収していた。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。
- ※ 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