

(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 報告書

2016 年 2 月 29 日提出

氏名	江口 直
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
出張期間	11 月 23 日~12 月 21 日
目的	コウモリのフィロウイルス、インフルエンザウイルス保有状況の疫学調査

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)

《出張の目的》

フィロウイルスは人を含む霊長類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。本演習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）。

また近年コウモリから新規インフルエンザウイルスの遺伝子が検出された。A 型インフルエンザウイルスの表面糖タンパク質 Hemagglutinin (HA) および Neuraminidase (NA) は、抗原性によって HA は H1~16、NA は N1~9 の亜型に分類されている。しかし検出されたコウモリの HA と NA は既存の A 型インフルエンザウイルスとは異なり、HA はシアル酸結合能、NA はノイラミニダーゼ活性を有していない。また、感染性ウイルスが分離されていないため、コウモリ由来インフルエンザウイルスについての報告はごく少数となっている。

《活動内容》

本演習では捕獲したコウモリから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行った。サンプリングは Ndola 市内、SueSueman (Lusaka 市内の洞窟)、Kasanka 国立公園の 3 ヶ所で行い、食果コウモリ的一种である *Eidolon helvum*、*Rousettus aegyptiacus* および食虫コウモリ的一种である *Hipposideros gigas* とされる個体を計 132 頭捕獲した。捕獲した個体から採血し、体高・翼長と体重を記録した。解剖して得た各種臓器の乳剤を作成し、VeroE6 細胞に接種することでウイルスの分離、乳剤から RNA を抽出し RT-PCR によるフィロウイルスとインフルエンザウイルス遺伝子の検出を試みた。RT-PCR で使用した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インフルエンザウイルス NP および M 遺伝子検出用のものを使用した。

標的遺伝子	プライマー名	配列
Filovirus NP	FiloNP-Fm	TGGCTTACYACAGGYCACATGAAAGT
	FiloNP-Rm	GTGTGTGATTTTCAGTTTTTYTGGAGGTGGAA
	FiloNP-Fe	TGGCAATCAGTDGGACACATGATGGT
	FiloNP-Re	GAAGCTGATTTTCRTTCTTYTTCTGATGGAA
Influenza A virus M	Influ-M_220F	TCACTGTGCCCTGTGAGAAG
	Influ-M_763R	TGGATTCCCATCCTTTTCTG
Influenza A virus NP	H17N10_NP_502F	AGAACAGGAATGGACCCAAG
	N17N10_NP_914R	TTTCAAAGTCAAACCCTCTGG

表 1. 日本で設計してザンビアで使用したプライマー一覧

《結果》

今回捕獲したコウモリのうち Ndola 市内で捕獲した 56 頭からはインフルエンザウイルスおよびフィロウイルスの遺伝子は検出されなかった。

《感想》

ウイルスの保有状況の調査をするにあたり、インフルエンザウイルスの遺伝子を検出するため自ら **Primer** を作成して意気揚々と乗り込んだ。コウモリのサンプリングは国立公園や洞窟、市街地にて行われた。本サンプリングではエボラウイルスの保有動物を調査する最もな名目があるよう考えていた。しかしサンプリングを行う上で多くの承認を受ける必要があり、疫学活動には多大な縛りがあるよう感じた。苦勞して得たコウモリのサンプルを **RT-PCR** をした結果フィロウイルス、インフルエンザウイルス陽性の疑わしいバンドは得られるのだが、コウモリ由来の遺伝子を増幅してしまうケースのみであった。今回コウモリの捕獲からウイルス遺伝子の検出および感染性ウイルスの分離までの一連の作業をしたことは、感染症の広がりについて考えるためのよい経験と足がかりになる。貴重な経験ができて幸いに思う。

また滞在中にエボラウイルスに感染の疑いのある血清サンプルがザンビア大学に届いた。ザンビア大学は国内で唯一のエボラウイルスを診断できる施設がある。サンプルが届くと場の空気は張り詰めていき、担当者は患者の臨床症状を一つ一つ確認していた。サンプルが届いてから 24 時間以内にエボラウイルスが陽性か陰性かを診断しなければならず、すぐに血清サンプルから **RNA** 抽出が行われ **RT-PCR** がかけられた。エボラウイルスの診断では **RT-PCR** をかけバンドが出ない時でも、再度 **PCR** を

かけなおす。これは元のウイルス RNA が少なく、一回の RT-PCR ではバンドが見える検出限界以下となっていることもあるからだ。今ケースでは 2 回目の PCR で疑わしい位置にバンドが検出されたので、すぐに遺伝子配列を特定する作業に移った。本サンプルではエボラウイルス陰性の結果であった。しかしザンビア大学で働いているスタッフの仕事に対する使命感、責任感に感銘を受けた。

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邱博士、共同研究者である岡山大学の小川助教、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、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。



図 1. Kasanka 国立公園、*Eidolon helvum*、レンジャーとザンビア大学のスタッフ



図 2. 採血、体高測定の道具、サンプリング時の格好



図 3. ザンビア大学獣医診療所とエボラウイルス病疑いのサンプルが来た時の様子

(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。江口直君の博士課程のテーマはインフルエンザウイルスに対する抗体がもつ抗ウイルス活性の作用機序に関するものであるが、今回の調査で彼は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にも興味を抱き、プライマーを設計しその遺伝子検出を試みた。現地での慣れない野外活動に最初は困惑した様子を見せながらも次第に順応し、ザンビア大学のスタッフと積極的にコミュニケーションを図りながら活動を円滑に進められるようになった。本演習を通じて、江口君は海外の疫学活動に必要な専門知識と協調性を体得したと考えられる。この経験が、彼が One World - One Health の概念を理解し、人獣共通感染症の専門家として育つための礎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