

氏名	高舘 佳弘
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	平成 29 年 11 月 25 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保有状況の調査

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）

エボラウイルスおよびマールブルグウイルス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す。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、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国で問題となっているが、その詳しい感染経路や自然宿主については不明な点が多い。そのため、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。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礼人教授、吉田玲子特任助教と共にザンビアにおいて、自然宿主と考えられているコウモリからサンプルを採取し、臓器乳剤からの遺伝子検出、ウイルス分離および抗体調査のための血清分離を試みた。また、中国のコウモリから検出されたフィロウイルス（Bat filovirus DH04）の遺伝子検出も試みた。

ンドラ市内では食果コウモリ的一种であるストローオオコウモリを 34 個体捕獲した。ンドラでの捕獲の際はショットガンを用いて狩猟を行った。スースーマン村では食果コウモリ的一种であるエジプトルーセットオオコウモリを 32 個体、食虫コウモリ的一种であるカグラコウモリを 11 個体捕獲した。スースーマン村での捕獲にはハーブトラップ法を用いた。捕獲したコウモリは、ジエチルエーテルを用いた麻酔の下で、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（唾液腺、肺、肝臓、脾臓、腎臓、直腸、脳、三叉神経節、精巣）を採材した。ホモジナイザーを用いて各臓器から乳剤を作製した。ウイルス分離には①肺、肝臓、脾臓、腎臓の混合臓器乳剤、②直腸の臓器乳剤を用いた。作製した臓器乳剤は Vero E6 に接種しウイルス分離を試みた。接種後、細胞の状態（細胞の剥がれ具合や形態の変化について）を観察した。また、①の混合臓器乳剤の RNA を抽出し RT-PCR（一部は Nested PCR も試みた）によるウイルス遺伝子の検出を試みた。スクリーニング用プライマーとして、例年使用しているフィロウイルス検出用の Filo NP (Ogawa et al, J Virol Methods, 2011)、MARV VP35 (Amman et

al, PLoS Pathog, 2012) および MBG NP (Amman et al, PLoS Pathog, 2012)に加えて、Bat filovirus DH04 検出用の Bat filo (He B et al, Emerg Infect Dis, 2015)および Bat FV (He B et al, Emerg Infect Dis, 2015) も用いた。



図 1. シンドラ市内でのサンプリングの様子。

(左) 樹木に群がるストローオオコウモリ、(中央) コウモリを捕獲する調査チーム、(右) 捕獲したコウモリの麻酔、全採血、体重および体調の測定を行う調査チーム



図 2. スースーマン村の洞窟内でのサンプリングの様子。

(左) コウモリの捕獲に用いたハープトラップ（金属のフレーム内にはナイロンの糸を強く張っており、そこに接触し落下した個体は下の布袋に収まり逃げられないような仕組みになっている）、(右) 捕獲されたカグラコウモリ

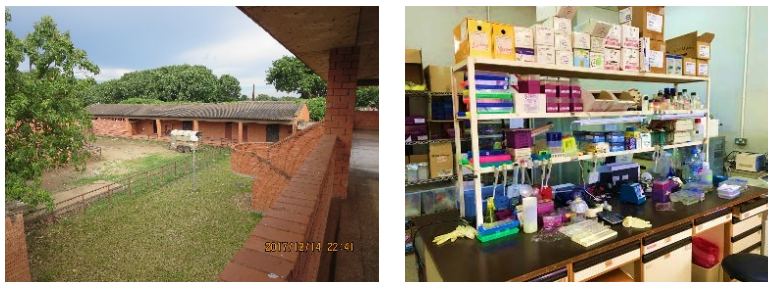


図 3. サンプルの解析に用いたザンビア大学獣医学部の様子。

(左) サンプリング道具が設置されている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外観、(右) サンプルの解析（遺伝子検出とウイルス分離）に用いた実験室内の様子

Vero E6 に接種した臓器乳剤サンプルに対して細胞変性効果（CPE）を示す検体が複数の個体（シンドラとスースーマン村で回収した両サンプル）から確認された。一代目の接種では、乳剤に含まれる臓器由来の消化酵素が細胞に影響を与えることが考えられる。現在、これらのサンプルがウイルスの存在によりの CPE を引き起こ

されているのかを確認するために、二代目の盲継代を実施している。また抽出した RNA を鋳型とした RT-PCR は FiloNP、Bat filo および Bat FV 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。一方で、MARV VP35 および MBG NP のプライマーセットで増幅される遺伝子産物と同程度のサイズのコウモリ（ンドラ市内のストローオオコウモリの 3 サンプルおよびスースーマン村のエジプトルーセットオオコウモリの 3 サンプルから MARV VP35、ンドラ市内のストローオオコウモリの 2 サンプルから MBG NP）の増幅が確認された。現在、遺伝子配列の決定を行っている。また、血清を用いた ELISA の結果により、今回捕獲されたコウモリのうち複数の個体はフィロウイルスの GP に対する抗体を保有しており、これらのコウモリは過去に感染歴が有ることが示唆された。

今回の調査ではスクリーニングの方法を変更したため、例年以上に遺伝子検出に時間がかかり、増幅遺伝子のシーケンスの解析を終了できなかった。陽性が疑われるバンドは単一ではなく、複数の帯状に広がっているものも存在しているため、得られた遺伝子断片が細胞由来のものである可能性は否定できない。過去にコウモリからエボラウイルスの遺伝子断片が検出された報告が 1 例、マールブルグウイルスの遺伝子断片が検出されたことが僅か 4 例（そのうち分離は 2 例）しかないことから、①コウモリが自然宿主であるものの、サンプリングの時期や地域によって、ウイルスの保有率が異なり、検出状況に影響を与えること、②他の種の動物が自然宿主であり、コウモリに拡散したウイルスが偶発的に検出されていたこと、③コウモリが自然宿主であるものの、検出技術が整っていないこと、④コウモリが自然宿主であるものの、特殊な免疫を持っており、体内や群内でのウイルスの循環が検出に影響を与えていること、⑤フィロウイルス感染症が地方病として考えられており、他の市場価値の高いとされている人獣共通感染症（例えば狂犬病）に比べ、研究が展開されていなかったこと、以上の 5 つが予想される。そのため、以上の問題点を考慮して、今後も継続的に疫学調査に励んでいきたい。

また、ザンビアの共同研究者と交流し、アフリカ諸国での人獣共通感染症による被害の大きさや、海外の研究環境や国際協力の重要性を体感できたことも、自身にとってプラスになったと思う。今後は、自身の実験においても視野を広げた研究をおこない、開発国で苦しんでいる方々に希望を与えられるよう頑張っていきたい。

最後に今回ザンビアにてサンプリングおよび解析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永晋博士および播磨勇人博士、当研究室の梶原将大博士および衛藤芳樹専門職員、SATREPS の横井健二業務調整員、岡山大学の小川寛人助教、同伴し指導していただいた高田教授、吉田特任助教および協力および支援していただいた全ての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。今までアフリカ大陸で見つかったフィロウィルス種のみならず、近年中国にて新たに見つかったフィロウィルス様ウィルスの検出のためのプライマーを設計し、そ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。市街地および洞窟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。また、JICA および AMED による SATREPS の最終年度評価に関連する会議やミーティングへの出席を通して、日本国の事業として行っている国際研究・協力活動への理解が深まった事が期待される。さらに、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様々な分野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 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：VETLOG で UPLOAD

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