

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

アフリカにおけるウイルス性人獣共通感染症の調査研究

(ザンビア)

平成 24 年度実施報告書

代表者：高田 礼人

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター・教授

<平成 24 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

(本プロジェクトのねらい、これまでのプロジェクトの概要、プロジェクト進捗状況、プロジェクト成果、今後の見通し等について、簡単に、分かり易く、数百字から1千字程度にまとめて下さい。)

ザンビアで野生動物、家畜およびヒトの検体を収集し、保有ウイルスを調査することによって、自然宿主、宿主域および伝播経路を解明する。また、野生動物が保有する未知のウイルスを探索し、病原体としてのリスクを評価する。さらに、ウイルス性人獣共通感染症の診断法開発および疫学調査をザンビア大学の研究者と共同で実施することによって、ザンビアにおける本分野の研究・教育体制を整備するとともに人材を育成する。

本年度は、協力計画(プロジェクトデザイン)を策定するとともに、ザンビア及び実施機関の実施体制の現状を含め、プロジェクトに必要な情報を収集、分析することを目的に、2012年11月26日から12月4日まで現地調査を実施した。プロジェクト実施について、ザンビア教育・科学・職業訓練・早期教育省(MESVTEE)及びザンビア大学(UNZA)と合意に至った(M/M署名)。研究面では、エボラザイルウイルスの核蛋白質(NP)遺伝子をクローニングし、組み換えNP発現系を確立した。NPに対するモノクローナル抗体を、ザンビア大学の研究員と共同で作出した。また、近年新しく発見された新種のフィロウイルスの蛋白質をコードする遺伝子を合成し、組み換え遺伝子発現系を確立するとともに、ELISA抗原としての有用性を確認した。

今後、その他のウイルスに関しても同様に進めるとともに、これまでに作出した抗体および組み換え蛋白質を診断法開発に応用する。また、開発・改良した方法を用いて、動物およびヒトの疫学調査を実施する。

2. 研究グループ別の実施内容

研究項目1:診断・治療法の開発

① 研究のねらい

ウイルス抗原およびウイルス特異抗体を高感度で迅速に検出する手法を開発・改良する。

② 研究実施方法

1) 組み換えウイルス蛋白質を発現・精製し、抗体作成のための免疫原として利用するとともに、ウイルス特異抗体検出のためのELISA法等に供する。また、培養が困難なウイルスに関して、シュードタイプウイルスを活用する。

2) ウイルス蛋白質に対する抗血清およびマウスモノクローナル抗体を作出し、特異性を基にイムノクロマト法、免疫組織染色法およびサンドイッチELISA法等の抗原検出診断法に供する。

3) モノクローナル抗体の診断・予防・治療薬への応用を検討する。

4) コンピュータ解析によって、ウイルス遺伝子上の特異的配列および共通配列を探索する。

5) 遺伝子配列解析に基づき新規プライマーセットをデザインし、RT-PCR法およびLAMP法などを確立する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

エボラザイルウイルスの核蛋白質(NP)遺伝子をクローニングし、組み換えNP発現系を確立した。NPに対するモノクローナル抗体を作出した(日本で)。また、近年新しく発見された新種のフィロウイルス(LLOV)の蛋白質をコードする遺伝子を合成し、組み換え遺伝子発現系を確立するとともに、ELISA抗原としての有用性を確認した。当初の計画(全体計画)に対して、概ね順調に進んでいる。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
モノクローナル抗体作出をザンビア大学のスタッフと一緒に実施することによって、日本で抗体作出技術を学ばせた。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特になし

研究項目2:自然宿主および伝播経路の解明

① 研究のねらい

ザンビアを取り囲む国々で毎年のように発生しているエボラおよびマールブルグ出血熱、ザンビア国内で2008年に発生した新種のアレナウイルスによる出血熱、もしウイルスが侵入した場合にはザンビアの養鶏業界に深刻な打撃を与えるであろう鳥インフルエンザ等について、野生動物・家畜・家禽等が保有するウイルスのサーベイランスをザンビア大学獣医学部との共同研究として実施する

② 研究実施方法

- 1) ザンビア国内で野生動物(コウモリ、げっ歯類、霊長類、水禽類等)および家畜等から血液、臓器および糞便等を採取する。
- 2) 既存の手法および研究項目1で開発する新規手法を用いて、採取した臓器および血清サンプルからウイルス遺伝子およびウイルス特異抗体の検出を試みる。
- 3) 必要に応じてウイルス分離を試みる。レベル 4 病原体であることが疑われる場合、米国 NIH の BSL-4 施設を使用して実験を継続する。
- 4) ザンビア国外への持ち出し可能なサンプルについて、マイクロアレイ法あるいは次世代シーケンサー等を活用し、未知の病原体遺伝子を探索する。
- 5) 感染性ウイルスまたはウイルス遺伝子が検出された場合には、塩基配列を決定し、進化系統解析を行う。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ザンビア大学およびザンビア野生動物局の協力によって、コウモリから血液、臓器および糞便等を採取した。既存の手法を用いて、採取した臓器および血清サンプルからフィロウイルス遺伝子の検出を試みたが陰性であった。さらに、ザンビアに飛来する野生水禽の糞便サンプルから、H10N7 亜型のインフルエンザウイルスを分離し、ライブラリーに追加した。未知のウイルスに関して、ザンビア国外への持ち出し可能なサンプルについて、マイクロアレイ法あるいは次世代シーケンサー等を活用し、未知の病原体遺伝子を探索する体制を整えた。

- ③ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
これまでに、インフルエンザウイルスの分離・同定技術を移転した。国内で発生している H1N1 インフルエンザへの対応について、技術情報を交換した。
- ⑥ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特になし

研究項目3:宿主域および病原性決定因子の探索

① 研究のねらい

分離されたウイルスの病原性および宿主域を決定する因子を推定し、リスクを評価する。

②研究実施方法

- 1) 感染性ウイルスが分離された場合、様々な培養細胞および動物に接種し、増殖性および病原性を解析する。レベル 4 病原体の場合、米国 NIH の BSL-4 施設を使用して実験を行う。
- 2) ウイルス遺伝子をクローニングし全塩基配列を解析するとともに、病原性発現および宿主域を決定する因子を分子レベルで探索する。
- 3) サーベイランスを継続すると共に、得られた成績をもとに病原体としてのリスクを評価する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

未着手。ウイルスが分離された場合を想定している。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
今後分離されるウイルスの増殖性および病原性を解析するための、動物飼育アイソレーターのザンビア大学への導入を決定した。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特になし

3. 成果発表等

(1)原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)
- ③ 論文詳細情報

(2)特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1)「北海道大学」グループ(アフリカにおけるウイルス性人獣共通感染症の調査研究)

- ① 研究者グループリーダー名: 高田 礼人 (北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授)
- ② 研究項目
 - 1: 診断・治療法の開発
 - 2: 自然宿主および伝播経路の解明
 - 3: 宿主域および病原性決定因子の探索

以上