

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780215

研究課題名 (和文) ザンビアにおける感染性微生物の網羅的探索

研究課題名 (英文) Surveillance of infectious microbes in Zambia

研究代表者

石井 秋宏 (ISHII AKIHIRO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・助教

研究者番号：90421982

研究成果の概要 (和文)：アフリカ・ザンビア共和国で verbet moneky 100 頭、ヒヒ 100 頭、および齧歯類約 200 匹を採集した。サル脾臓試料から、ワシントン大学 (ミズーリ州) との共同研究でマイクロアレイおよびハイスループットシーケンスによる網羅的探索で新規サル免疫不全ウイルスを検出し、分離培養した。また、齧歯類試料から新規アレナウイルスおよび、Q 熱の原因菌である *Coxiella burnetti* を検出した。

研究成果の概要 (英文)：In Republic of Zambia, 100 verbet monkeys, 100 baboons and about 200 rodents were collected. By microarray and 454 high-through put sequencing techniques, a new simian immunodeficiency virus was detected and isolated from monkey and baboon spleen sample. From rodent samples, a new arenavirus and a bacterium *Coxiella burnetti* which is cause Q-fever were found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ライフサイエンス (共通基礎研究)

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症、ザンビア、網羅的探索、Virochip、454 シークエンス、16S rDNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、エボラ出血熱や、SARS、新型インフルエンザといった新興のウイルス感染症や、結核、ペスト等の細菌を原因とする再興感染症が世界規模で問題となっている。これらの多くは野生動物や家畜等がレゼルボアとなりヒトへと伝播する人獣共通感染症である。新たに感染症が問題となってきた一つの原因とし

て、開発や交通機関の発展に伴う環境－動物－ヒト間の接触や交流の多様化、広域化が挙げられる。特に航空機による輸送は病原体の世界的拡散にもつながっており、感染症の発症・流行は一国の国内だけの問題では無くなっている。例えばアジア、アフリカといった地域の発展途上国、その中でも地方部においては自然環境と家畜、ヒトが密接に接しながら、

不十分な衛生環境や医療体制によって感染症が発生しやすい状態にあり、そこから都市部の人口密集地域を經由して世界各国へと拡散していくという状況が容易に起きると考えられる。実際に中国内陸部で発生した SARS は WHO の統計では、2002 年 11 月から終息するまでの 2003 年 7 月までの間に 32 カ国まで拡大し、感染者数 8,437 名、死亡者数 813 名という犠牲者を出しており、発展途上国のみならず、世界各国での新興・再興感染症への対策が重要な課題となっている。

## 2. 研究の目的

人獣共通感染症の予防や治療には、病原体の宿主動物を明らかとすることや、動物とヒト体内における微生物の感染機構、増殖機構の解明等が必須となる。また、パンデミックや大規模なエンデミックを防ぐには、感染症の発生を予測して備えておく“先回り戦略”が必要であるが、新興・再興感染症の発生地域となりうる発展途上国においては、国内で発生している感染症の事例を統計するための基盤が弱いことなどから、その流行を判断することが難しい状況にあると言える。さらに、病気を正確に診断する方法が少ないことから、一律にマalaria、結核等といった患者数の多い病気とされてしまうことも多く、そもそも正確な病原体の特定がされていない可能性すらある。また、例えば SARS は当初は原因不明の非定型肺炎とされていたが、最終的に新種のコロナウイルス感染症であることが判明した。調査の結果、キクガシラコウモリが、SARS ウイルスと交差する抗体が多く見られること、SARS 様コロナウイルスを多く保持していたことから、自然宿主として挙げられている。しかし、コウモリにおいては SARS-コロナウイルスの感染はなんら症状を示さないと考えられ、また保有されているウイルスにはヒトで見られるウイルスとは塩基配列が異なっている部分も多く、強力な病原性を獲得しヒトに感染するに至った変異の過程など不明な点が数多く残されている。SARS のみならず、多くのエマージングウイルスは現在でもその自然界での生活環や、変異の過程は解明されていない。今後発生しうる新興感染症について速やかな原因究明を行うためにも、現時点での病原性の有無にかかわらず、本来動物に保持されている潜在的感染性微生物の網羅的な情報を蓄積していくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究代表者は 2008-2009 年にアフリカ・ザンビア共和国に滞在し、首都ルサカや国立公園等で、人獣共通感染症の重要なレズルボアとされるサル、齧歯動物等から臓器、血液試料を採集した。これらの試料から核酸を抽出し、PCR 等の分子生物学的手法を用いて病原体の検出を行った。また、ワシントン大学（ミズーリ州）との共同研究で、ウイルス核酸を網羅したマイクロアレイ (Virochip) および、454 ハイスループットシーケンス技術を用いて、サル脾臓 RNA 中に存在する感染性微生物の網羅的探索を行った。

感染性の細菌の検出は、齧歯動物の肝臓試料から抽出した DNA を鋳型として、バクテリア 16S rDNA に対するユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、増幅された断片の塩基配列を決定する方法で網羅的探索を行った。

また、ザンビア共和国では 2008 年に出血熱の発生が報告された。この感染症は米国疾病予防管理センターによって、新規アレナウイルス (Lujo virus) によるものであったことが明らかとされた。アレナウイルスは西アフリカ周辺で発生するラッサ熱ウイルス等が属しているが、これまでザンビアではアレナウイルス感染症の発生の報告は無かった。そこで、ザンビアにおけるアレナウイルスのレズルボアの探索のため、齧歯動物試料から RT-PCR による検出を試みた。

増幅された遺伝子断片は北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンターにて塩基配列を決定し、Blast search による解析で既知の微生物との相同性比較を行い、系統樹を作成して既知微生物との類縁関係を明らかとした。

## 4. 研究成果

アフリカ・ザンビア共和国で verbet monkey 100 頭、baboon 100 頭、および齧歯動物約 200 匹を採集した。サル脾臓試料から、ワシントン大学（ミズーリ州）との共同研究で Virochip およびハイスループットシーケンスによる網羅的探索で新規サル免疫不全ウイルス (SIV) を検出し、分離培養した。遺伝的距離を利用した系統解析から、この SIV は HIV-2 を含む SIV のグループの祖先型であり (図 1, Zambia group 1, 2)、採集した Zambia, Lower Lupande game management area のサルの約 50% が感染していることが明らかとなった (表 1)。

図1. Phylogenetic tree analysis of Zambian SIVs

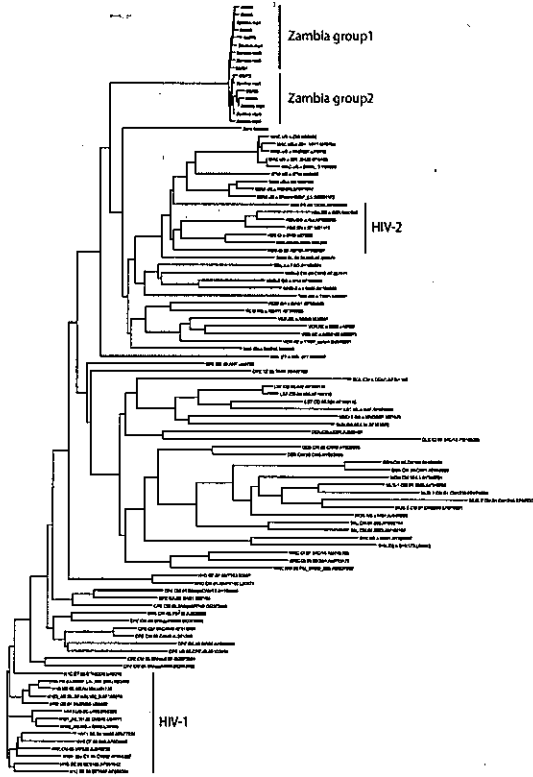
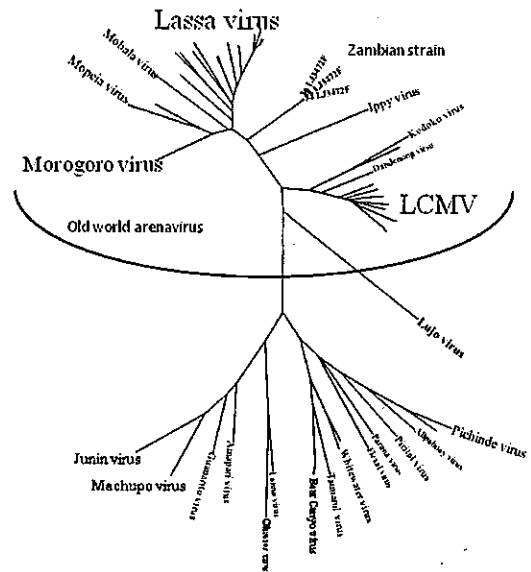


表1 Infection rate of SIV

Total	Baboon	Verbet monkey
Positive	57/100	48/100
Rate	57%	48%

また、2008年にザンビア共和国で発生した新規アレナウイルス(Lujo virus)による出血熱のレゼルポアを調査調べるため、齧歯類腎臓試料からアレナウイルスの検出を試みた。首都ルサカ近郊の齧歯類 53 検体中 10 検体、地方村であるナムワラ近郊の齧歯類 48 検体から 1 検体、新規アレナウイルスが検出された。同様に地方村のムフエ近郊の齧歯類 153 検体について調査したが、ここからは検出されなかった。塩基配列の相同性検索では、Mopeia virus と 70%の相同性を示し、系統解析では西アフリカで発生するラッサ熱ウイルス等のと Old World Arenavirus に属することが明らかとなった (図2)。

図2 Phylogenetic tree of a new arenavirus in Zambia



齧歯類の肝臓 DNA からの細菌の検出では、主に齧歯類の血中に寄生する *Bartonella* 属が検出されたが、いくつかの検体からは Q 熱や日和見感染症に関係する病原性微生物が検出された (表2)。この結果は、宿主内に存在方法の有用性を示した。これまでザンビアでは報告されていない、Q 熱の感染の可能性を示唆した (表2)。

表2 Detected pathogenic bacteria from Zambia rodents

Sample	pathogenicity	Definition	identity (%)
ZR06-0-03	opportunistic	1 Acinetobacter junii strain HC0506300-1	97
ZR06-0-15	opportunistic	1 Bartonella sp. 15908	95
ZR06-0-17	opportunistic	1 Acinetobacter junii strain WAB1 866	91
ZR06-0-18	opportunistic	1 Mycoplasma coxoides	89
ZR06-0-20	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	97
ZR06-0-23	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	98
ZR06-0-32	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	97
ZR06-0-35	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	96
ZR06-0-41	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	96
ZR06-0-42	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	96
ZR06-0-46	opportunistic	1 Acinetobacter baumannii isolata Bnjus3	96
ZR06-0-64	opportunistic	1 Acinetobacter calcooacticus	96
ZR06-0-77	opportunistic	1 Acinetobacter sp. CL1805	85
ZR06-0-78	opportunistic	1 Acinetobacter calcooacticus strain SEND01	97
ZR07-7-01	opportunistic	1 Bartonella sirovoda 16S	90
ZR07-7-02	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	91
ZR07-7-05	opportunistic	1 Bartonella sp. RP255YX	85
ZR07-7-13	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	88
ZR07-7-18	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	88
ZR07-7-24	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	86
ZR07-7-27	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	89
ZR07-7-30	opportunistic	1 Acinetobacter johnsonii strain WAB1 862	92
ZR07-7-31	opportunistic	1 Bartonella sp. LEV 16S	96
ZR07-7-32	opportunistic	1 Raistonia sp. 14C	90
ZR07-7-33	opportunistic?	2 Haemobartonella muris	93
ZR07-7-35	opportunistic	1 Bartonella sp. 16115	98
ZR07-7-37	opportunistic?	2 Haemobartonella muris	94
ZR07-7-44	opportunistic?	2 Hemophilus segnis strain FSK3099/96	91
ZR07-7-45	opportunistic	1 Mycoplasma coxoides	88
ZR07-7-49	opportunistic	1 Acinetobacter sp. 16S rRNA gene (strain 78)	88
ZR07-7-52	opportunistic	1 Acinetobacter sp. WAB1 867 strain WAB1 867	88
ZR07-7-57	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	89
ZR07-7-61	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	88
ZR07-7-62	Q fever	3 Coxiella burnetii Dugway 7E9-12	89

pathogenicity (ESL)

- 1. An opportunistic infection is rarely caused
- 2. An opportunistic infection is caused
- 3. An important disease is caused

5. 主な発表論等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 秋宏 (ISHII AKIHIRO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・助教

研究者番号：90421982