

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 24 年度博士課程 入学

氏 名 須田 遊人

指導教員名 堀本 泰介

論文題目

**Studies on characterization of nairovirus and
establishment of laboratory diagnostic systems**

(ナイロウイルスの性状解析および実験室診断系の構築に関する研究)

ナイロウイルスはブニヤウイルス科に属するウイルス属である。本ウイルス属には、人獣共通感染症の原因であるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV）やナイロビ羊病ウイルス、Issyk-Kul ウイルス（IKV）といった病原体が属する。CCHFV はナイロウイルス属の代表的なウイルスであり、CCHF を引き起こす。CCHF はヒトでの致死率が 30% 近くにも上る重篤な出血熱であり、その症例報告は地域、数ともに増加しており問題となっている。一方、CCHFV はバイオセーフティレベル（BSL）4 施設での取り扱いが求められるウイルスであり、そのため CCHFV を含むナイロウイルスの研究は未解明な部分が多い。CCHF の診断も、ウイルス分離や中和試験は感染性ウイルスを扱うため、BSL-4 施設がなければ行えない。CCHF のような重要な疾病に対しては複数の実験系による診断が、非流行国である日本などでは望まれており、それに用いられる新規の実験系の構築や、研究に用いることができる新規のツールの構築が求められている。

ナイロウイルスは 7 つの血清型に分類される。例えば、CCHFV は Hazara ウイルス (HAZV) と CCHF グループを構成している。しかし、新規ウイルスの発見とともに IKV や Soft tick bunyavirus (STBV) など未分類のウイルスも多くなっている。ナイロウイルスの詳細な理解のためには、これらのウイルスの性状解析や血清学的研究が必要となり、その解析はナイロウイルス感染症の制御に貢献する。

本研究では、代表的なナイロウイルスである CCHFV および新規ナイロウイルスを含む他のナイロウイルスの性状解析と血清学的診断法の構築を行った。

第一章では、新規に作製した CCHFV のシュードタイプウイルスを用いて感染機構の解析を行った。シュードタイプウイルスとは、目的ウイルスのエンベロープ蛋白質を被ったウイルスであり、水疱性口炎ウイルス (VSV) やレトロウイルス、レンチウイルスなどがそのベースに用いられる。これらシュードタイプウイルスは、BSL-2 施設での目的ウイルスの侵入機構の解析、目的ウイルスそのものを用いない代替法としての中和試験による血清診断を可能とするものとして、これまで様々なウイルスで利用されてきた。しかし、これまでに高力価を示す CCHFV のシュードタイプウイルスの作製はなされていなかった。そこで、ウイルス粒子への取り込みを制御しうる CCHFV のエンベロープ蛋白質 (GP) の C 末端領域を一部欠損させたものを作製に用いることで、VSV ベースの高力価の CCHFV シュードタイプウイルスの作製を試みた。さらに、それを用いて代表的な C 型レクチンである DC-SIGN と LSECtin について、その CCHFV の細胞への感染における影響を解析した。その結果、CCHFV の GP の C 末端を 53 アミノ酸欠損させたものを作製に用いることで、高力価のシュードタイプウイルスの作製が可能となることが明らかとなった。作製したシュードタイプウイルスを用いた解析の結果、野生型の CCHFV と似た感染性状を示し、さらにその感染は DC-SIGN によって増強されたため、CCHFV の感染が DC-SIGN を発現する樹状細胞やマクロファージなどに起こりやすいことが示唆された。

第二章では、第一章で作製した CCHFV シュードタイプウイルスを用いて、血清診断法である中和試験系を構築した。中和試験は特異性が高く、ウイルスの同定にも利用される診断法である。CCHF 流行地で提供されたヒト血清を用いて中和試験を行い、その結果を現在確立されている診断法である組換え核タンパク質を抗原とした ELISA の結果と比較した。その結果、構築した中和試験系は、ELISA と比較すると感度は劣るものの、高い特異性で CCHFV 抗体を検出できることが示された。さらに CCHFV そのものを用いた中和試験と比較して、同一血清で得られる抗体力価に大きな差はなく、シュードタイプウイルスを用いた中和試験系は BSL-2 施設で可能な代替中和試験法として使用できることが明らかとなった。

近年、新規のナイロウイルスの分離報告が複数なされている。ナイロウイルス全体のさらなる理解には、新規ウイルスを含めた性状解析が必要となる。そこで第三章では、HAZV、STBV、IKV の 3 種類のナイロウイルスについて、そのウイルス学的、血清学的な性状を比較した。STBV は、2014 年に日本でコウモリマルヒメダニから分離された新規ナイロウイルスである。IKV は、ヒトに発熱やめまい、吐き気を引き起こす Issyk-Kul 熱の病原体であり、中央アジアでその存在が認められているが研究報告は極めて少ない。HAZV は、遺伝学的、血清学的に CCHFV に近縁だが非病原性で、BSL-2 施設での取り扱いが可能なウイルスである。血清学的な比較にあたり、新規に ELISA 系の構築も行った。STBV のゲノム解析から、STBV と IKV が遺伝学的に近縁であることが明らかとなった。培養細胞でのウイルス増殖性の比較の結果、STBV と IKV は類似の性状を示したが、HAZV ではこれらとは異なるウイルス増殖性が認められた。また、血清学的な解析においても、STBV と IKV の間には抗原交叉性が認められたが、HAZV との抗原交叉性は非常に低かった。これらの結果は、ナイロウイルス間におけるウイルス学的、血清学的多様性の存在を示してい

と考えられた。さらに、構築した血清診断系を用いてヒトの STBV 感染の血清疫学解析を行った。その結果、ヒトの STBV 感染リスクはない、もしくは極めて低いことが示された。構築した血清診断系は、今後のさらなる疫学解析や診断に有用なツールとなることが期待される。

本論文において、筆者はナイロウイルスの性状解析ならびに血清診断系の構築を試みた。構築したシュードタイプウイルスは高力価を示し、CCHFV の侵入機構の解析や、代替中和試験への利用などに強力なツールとなると期待される。また、新規ナイロウイルスを含む比較解析によりナイロウイルスの多様性が明らかとなったが、比較にあたって構築した ELISA 系などの血清診断系は、動物感染症学的かつ公衆衛生学的な見地において、ナイロウイルス感染症の診断や疫学解析に力を発揮することが期待される。以上のように、本論文で得られた知見は、ナイロウイルス感染症の理解と制御に貢献するものである。