

学 位 論 文 題 名

Phylogenetic and virulence analysis
of tick-borne encephalitis viruses in Japan and Russia

（日本とロシアのダニ媒介脳炎ウイルスの系統樹および病原性の解析）

学位論文内容の要旨

ダニ媒介性脳炎（TBE）は極東アジアからヨーロッパにわたるユーラシア大陸の広大な地域に流行しているウイルス性人獣共通感染症である。本症は毎年数千人の患者発生報告があり、5～30%の高い致死率の重篤な脳炎を特徴とし、回復しても高率な後遺症を残す。地域により異なる型のTBEウイルスが分布しており、また極東ロシア・シベリア地区のTBEはヨーロッパ地区にくらべ重症例が多いと報告されている。近年、ロシアにおいてはTBE患者発生数が増加傾向にあり、その対策が必要とされている。

一方、日本においてはTBE患者の報告はこれまでなかったが、1993年に北海道上磯町ではじめてTBE患者が確認された。その後の1995～1996年における調査により、当地区のマダニおよび野ネズミからTBEウイルスが分離され、流行巢の存在が確認された。さらに、家畜血清を用いた疫学調査から、北海道南部のいくつかの地域にTBEの流行巢の存在が示唆された。

本研究では、ロシアおよび日本のTBEの予防法確立の基礎資料とするため、TBEウイルス北海道株、極東株およびシベリア株についての比較・解析を行った。はじめに、北海道のTBEウイルスの起源を調べるために、分子系統解析によって北海道株と極東株との分岐年代を推定した。つづいて、各地区からの分離ウイルス株について、ウイルス亜型の同定および分子系統解析、塩基配列・アミノ酸配列によるウイルス遺伝子の比較・検討を行った。また、それぞれのTBEウイルス株について抗原性と毒力について比較・検討した。さらに、ヨーロッパのTBEワクチンが極東・シベリア地区に分布するTBEウイルス株に対して有効かどうか検討した。

北海道のTBEウイルスの起源を明らかにするために、北海道と極東ロシアのTBEウイルス株の分岐年代を推定した。1998年にハバロフスクで採集されたシュルツェマダニからウイルス分離を行い、北海道株とともにウイルス遺伝子（エンベロープ蛋白領域）の塩基配列を決定した。これらのウイルスの分子進化（同義置換）速度を推定したところ、 2.9×10^{-4} 塩基/座位/年となった。そこで、同義置換距離を基にした系統樹を作成し、進化速度と系統樹より分岐年代を推定したところ、北海道株と極東ロシア株はおよそ260～430年前に分岐したと推定された。したがって、北海道のTBEウイルス

は少なくとも数百年前に極東のTBEウイルスと分岐し、存在していたと考えられた。

極東ロシア（ウラジオストク、ハバロフスク）およびシベリア（イルクーツク）地区に分布するTBEウイルスの亜型を調べるために、各地区において1998～1999年にかけて、シュルツェマダニを採集しウイルス分離を試みた。分離ウイルスについて遺伝子塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。その結果、極東ロシア地区とイルクーツク地区にはそれぞれ異なる亜型のウイルス（極東型およびシベリア型）が分布することが明らかとなった。両亜型ウイルス株の抗原性は中和試験では交差反応を示したが、単クローン抗体への反応性では、少し異なることが示された。また、エンベロープ蛋白の推定アミノ酸配列の比較により、イルクーツク株に特異的なアミノ酸（グルタミン酸またはヒスタミン；234番目）が確認された。北海道、極東ロシアおよびシベリア地区に分布するTBEウイルスの毒力を、マウスモデルを用いて比較した。北海道株および極東ロシア株は神経侵入性および神経毒力ともに同程度の毒力を示したが、イルクーツク株はそれらに比べ、神経侵入性および神経毒力ともにいくぶん高かった。さらに、イルクーツク株のLD₅₀値は北海道株および極東ロシア株にくらべ、約10～40倍低い値を示した。北海道株と極東ロシア株のLD₅₀値は同程度であった。したがって、イルクーツク株は北海道株と極東ロシア株に比べ高い毒力を持っている可能性が示唆された。

極東ロシアおよびシベリア地区におけるTBEの具体的予防法の確立のため、ヨーロッパで広く用いられているTBEワクチンの極東株およびイルクーツク株に対する有効性を検討した。TBEワクチンを接種した人の血清においてウラジオストク株、ハバロフスク株およびイルクーツク株のいずれに対して中和抗体の産生が確認された。さらに、マウスにTBEワクチンを接種した後、致死量のウラジオストク株、ハバロフスク株およびイルクーツク株で攻撃し、ワクチンの発症予防防御効果を調べた結果、PBS接種対照マウスでは70%の致死率であったが、ワクチン接種マウスではすべてが生存した。したがって、ヨーロッパのTBEワクチンは極東ロシアおよびシベリア地区におけるTBEウイルスに対しても有効であることが確認された。

TBEウイルスの遺伝子RNAの特徴の一つとして、3'非翻訳領域における塩基数が、ウイルス株によって大きく異なる点が知られている。そこで、本研究において分離されたTBEウイルス株について3'非翻訳領域の塩基配列を決定したところ、すべてのウイルスにおいて同程度の塩基数であることが確認された。用いたウイルスは実験室内での継代歴が少なく、自然界に分布するウイルス本来の遺伝子配列を反映しているため、今回示された3'非翻訳領域の塩基配列はウイルスが流行巣のマダニとノネズミの体内で存続していくために必須の配列であると考えられた。

本研究において、極東・シベリア地区に分布するTBEウイルスの亜型、抗原性および毒力が明らかにされ、これらのウイルスに対するワクチンの有効性も確認された。したがって、これらの成績は極東・シベリア地区におけるTBEの予防法の確立に関して貴重な情報となるものと思われる。さらに、本研究で分離されたTBEウイルスは、実験室内における継代歴が少ないため、自然界におけるTBEウイルスの進化、病原性の解析および新世代ワクチンの開発などの今後の研究に有効に活用できるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	高 島 郁 夫
副 査	教 授	喜 田 宏
副 査	教 授	小 沼 操
副 査	助教授	荻 和 宏 明

学 位 論 文 題 名

Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses in Japan and Russia

(日本とロシアのダニ媒介脳炎ウイルスの系統樹および病原性の解析)

ダニ媒介性脳炎 (TBE) は極東アジアからヨーロッパにわたるユーラシア大陸の広大な地域に流行しているウイルス性人獣共通感染症である。日本においてはTBE患者の報告はこれまでなかったが、1993年に北海道上磯町ではじめてTBE患者が確認された。その後の調査により、当地区のマダニおよび野ネズミからTBEウイルスが分離され、流行巢の存在が確認された。

本研究では、TBEウイルス北海道株の起源を推定し、極東・シベリア各地区の分離ウイルス株について、ウイルス亜型の同定を行った。さらに、ヨーロッパのTBEワクチンが極東・シベリア地区に分布するTBEウイルス株に対しても有効かどうか検討した。

北海道のTBEウイルスの起源を明らかにするために、北海道と極東ロシアのTBEウイルス株のウイルス遺伝子 (エンベロープ蛋白領域) の塩基配列を決定し、これらのウイルスの分子進化 (同義置換) 速度を推定した。同義置換距離を基にした系統樹を作成し、進化速度と系統樹より分岐年代を推定したところ、北海道のTBEウイルスは少なくとも数百年前に極東のTBEウイルスと分岐したと考えられた。

極東ロシア (ウラジオストク、ハバロフスク) およびシベリア (イルクーツク) 地区に分布するTBEウイルスの亜型を調べるために、各地区において、シュルツェマダニを採集しウイルス分離を行い、分子系統樹解析を行った。その結果、極東ロシア地区とイルクーツク地区にはそれぞれ異なる亜型のウイルス (極東型およびシベリア型) が分布することが明らかとなった。

ヨーロッパで広く用いられているTBEワクチンの極東株およびイルクーツク株に対する有効性を検討したところ極東ロシアおよびシベリア地区のTBEウイルスに対しても有効であることが確認された。

本研究において、日本およびロシア極東・シベリア地区のTBEウイルスの性状が明らかになり、ワクチンの有効性が確認された。したがって、これらの成績は極東アジア地区におけるTBEの予防法の確立に関して貴重な情報となるものと思われる。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者早坂大輔氏が博士 (獣医学) の学位を授与されるのに十分な資格を有するものと認めた。