

学 位 論 文 題 名

Studies on the diagnostic methods and pathogenicity
of the West Nile virus

(ウエストナイルウイルスの診断法と病原性に関する研究)

学位論文内容の要旨

ウエストナイルウイルス(WNV)は日本脳炎(JEV)グループに所属するフラビウイルスで、蚊によって媒介され、ヒトやウマに致死性の脳炎を引き起こす。1999 年まで、WNV はアフリカ、中近東、中央、西アジア、インド、ヨーロッパに分布していたが、1999 年 8 月にアメリカのニューヨーク(NY)において西半球で初めての流行がみられた。それ以降アメリカにおける流行は拡大をつづけているが、ヒト用の効果的ワクチンや治療法はまだ開発されておらず、世界的に公衆衛生上の問題となっている。さらに、NY で分離された WNV(NY 株)の遺伝子配列は 1998 年にイスラエルで分離された株と酷似しており、感染したヒト、動物、蚊または他の宿主動物などによって、イスラエルからアメリカに持ち込まれたことが示唆されている。アメリカとの関連の深い日本においても、ヒトの交流や物流による WNV の侵入が懸念されている。WNV の侵入を防ぐためにはその診断法の確立が急務である。日本などの JEV 流行地においては WNV と JEV の鑑別を行うことが、WNV の侵入を発見するために必要となる。しかし JEV グループに属するフラビウイルスは互いに交差免疫反応をおこすため、血清学的診断法ではウイルスの鑑別を迅速に行うことは難しく、遺伝学的な診断法の開発が必要である。

本学位論文ではまず WNV の遺伝的診断法に関する検討を行った。始めに RT-PCR RFLP 法を用いた WNV の診断法を確立した。RT-PCR RFLP 法は安価で簡便であり、点突然変異を検出するのに有用である。この診断法は非構造蛋白(NS)1 領域に存在する WNV と JEV の共通配列をプライマーとして使い、一種類の制限酵素(*TaqI*)を用いる方法である。

次にさらに感度のよいリアルタイム PCR 法を用いた WNV の診断法を確立した。リアルタイム PCR 法による WNV の検出法は RT-RCP 法より感度が高く、ヒトのサンプルなど高感度を要求される場合は有用である。リアルタイム PCR 法による WNV の検出法はいくつか開発されているが、これらは WNV のみを検出するか、または WNV の中でも NY 株のみを検出するように設計されている。JEV の流行地では、確定診断を下すためには WNV と JEV に対する検出をともに試みる必要がある。ゆえに本研究ではリアルタイム PCR 法を用いた WNV と JEV の鑑別を行うことのできる診断法の開発を試みた。

本法は WNV と JEV の C 蛋白領域に存在する共通配列をプローブとして用い、特異的プライマーによってアッセイの特異性を確保した。以上により、JEV 流行地における WNV の侵入に備えた遺伝的診断法が確立されたと考えられる。

さらに NY における WNV の流行では、本来病原巣動物である野生鳥類の大量死が見られたが、これは既存株の流行ではみられなかった現象である。これは NY 株の病原性が既存株とは異なることを示唆する。ゆえに NY 株の病原性を解明することは新たなワクチンや治療法に役立つと考えられる。そこで本研究の後半では WNV 感染マウスモデルを用いて WN ウイルスの病原性の解析を行った。まず致死性の NY 株、および非致死性の Eg101 株の実験感染マウスモデルを用いて、WN 脳炎における各種ケモカイン (RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, IP-10/CXCL10, BLC/CXCL13, BMAC/CXCL14) の発現の解析を行った。RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IP-10 の mRNA は NY 株感染マウスの脳において高レベルで発現していた。一方で BLC はどちらのグループでも発現がみられず、BMAC は非致死性の Eg101 株感染マウスの脾臓において、感染後期に NY 株感染マウスよりも高いレベルの発現が見られた。これらの結果から RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IP-10、BMAC が WN 脳炎において重要性を持つことが示唆された。

次にプラーク精製によって分離された点突然変異株を用いて、ウイルスのエンベロープ(E)蛋白における糖鎖付加と神経侵襲性との関連を調べた。2 種類の NY 株からプラーク精製によって 4 株を分離したところ、E 蛋白の N 型糖鎖付加領域にアミノ酸変異が見られた。4 株のうち 2 株のみが糖鎖付加領域を持つウイルスであった。6 週齢の BALB/c マウスにこれらの分離株を皮下接種したところ、糖鎖付加領域を持つウイルス株を感染させたマウスは高い死亡率を示し、糖鎖付加領域を持たないウイルスを感染させたマウスはほとんど死亡しなかった。一方、脳内接種においては糖鎖付加領域を持つウイルス株、持たないウイルス株ともに致死性感染を示した。これらの結果から E 蛋白における糖鎖付加が WNV の神経侵襲性をもたらすことが示唆された。以上の結果は、NY 株の病原性に関する新しい知見であり、新たなワクチンや治療法への重要な基礎データとなると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 助 教 授 荻 和 宏 明

学 位 論 文 題 名

Studies on the diagnostic methods and pathogenicity of the West Nile virus

(ウエストナイルウイルスの診断法と病原性に関する研究)

ウエストナイル(WN)ウイルスは日本脳炎(JE)ウイルスグループに所属するフラビウイルスで、蚊によって媒介され、ヒトやウマに致死性の脳炎を引き起こす。WN ウイルスはこれまでアフリカ、中近東、中央アジア、西アジア、インド、ヨーロッパに分布していたが、1999年8月にアメリカのニューヨーク(NY)において西半球で初めての流行がみられた。それ以降アメリカにおける流行は拡大を続けており、世界的に公衆衛生上の問題となっている。

本研究ではまず RT-PCR RFLP 法を用いた WN ウイルスの診断法を開発した。この診断法では非構造蛋白領域に存在する WN ウイルスと JE ウイルスの共通配列をプライマーとして用いウイルス遺伝子を増幅させた。増幅産物を一種類の制限酵素(*TaqI*)を用いて切断し、泳動パターンを比較し、WN ウイルスと JE ウイルスの鑑別が可能となった。

次にリアルタイム PCR 法を用いて、WN ウイルスと JE ウイルスの鑑別を行うことのできる診断法の開発を試みた。本法では WN ウイルスと JE ウイルスの C 蛋白領域に存在する共通配列をプローブとして用い、特異的プライマーによってアッセイの特異性が証明された。

WN ウイルス株の病原性を解明するために、致死性の NY 株、および非致死性の Eg101 株の実験感染マウスモデルを用いて、WN 脳炎における各種ケモカインの発現の解析を行った。RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IP-10 の mRNA は NY 株感染マウスの脳において高レベルで発現していたため、これらのケモカインが WN 脳炎において重要なことが示唆された。

次にプラーク精製によって分離された点突然変異株を用いて、ウイルスのエンベロープ(E)蛋白における糖鎖付加と神経侵襲性毒力の関連を調べた。2 種類の NY 株からプラーク精製によって 4 株を分離したところ 2 株が E 蛋白に糖鎖付加配列を持つウイルスであった。6 週齢の BALB/c マウスの皮下接種では、糖鎖付加配列を持つウイルス株を感染させたマウスは高い死亡率を示し、糖鎖

付加配列を持たないウイルスを感染させたマウスはほとんど死亡しなかった。これらの結果から E 蛋白における糖鎖付加が WN ウイルスの神経侵襲性をもたらすことが示唆された。

本研究において WN ウイルスの診断法が確立され NY 株の病原性に関する新しい知見が得られた。よって審査員一同は、上記博士論文提出者白戸憲也氏が博士（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。