

学位論文題名

Genetic analysis and development of new diagnostic assays of Newcastle disease virus

(ニューカッスル病ウイルスの遺伝子解析と新規診断法の開発)

学位論文内容の要旨

ニューカッスル病 (ND) はトリパラミクソウイルス 1 型であるニューカッスル病ウイルス (NDV) によって引き起こされる伝播力の強い鶏の感染症である。近年でも世界各地で ND の発生が数多く報告されており、NDV の迅速診断法の開発及び分子疫学調査は、将来的に起こる ND の発生を制御する上でも重要である。以上の理由より、本研究では日本で分離された種々の NDV 株の系統樹解析を行い、さらに 3 種類の新規分子診断法の開発を行った。

NDV の nucleocapsid 蛋白 (NP) 遺伝子全長を用いた系統樹解析の結果、日本で分離された NDV 株 (1970 年代以前の古い株及び 1980 年代以降の新しい株) は、大きく 2 つのグループ、即ち病原性の株で構成されるグループと非病原性のグループ、に分類された。また制限酵素を用いた解析の結果、病原性 NDV の NP 遺伝子より増幅された PCR 産物は、*Pst*I により消化されないが、非病原性 NDV 由来の PCR 産物は消化されることが明らかとなった。このような *Pst*I を用いた RT-PCR-制限酵素断片長解析 (RFLP) は、NDV 株の病原型推定のための一次スクリーニング法として使用できることが示された。

次に簡便な遺伝子増幅法である、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の ND 診断への応用を検討した。NDV の fusion 蛋白 (F) 遺伝子を標的として設計したプライマー群を用いた LAMP 法により、通常の恒温水槽あるいはヒートブロックを使用するだけで、2 時間以内に臨床材料より NDV を特異的に検出することができた。さらにこの LAMP 法は nested PCR 法と同程度の感度・特異性を示した。以上の結果より、この LAMP 法が迅速・簡便で高感度、経済的な NDV 同定法であることが示された。

高感度で特異的な NDV の病原型推定法として、F 遺伝子を標的とした SYBR Green I を用いたリアルタイム RT-PCR 法と melting-curve 解析法を開発した。この方法では、PCR 産物の電気泳動による解析ステップを必要とせず、感度は通常 RT-PCR の 100 倍であり、感染鶏由来組織材料より直接 NDV を検出できた、即ち強毒株 (verogenic) では $89.23 \pm 0.27^\circ\text{C}$ で、中等毒株では $90.17 \pm 0.35^\circ\text{C}$ で弱毒株 (lentogenic) では $91.25 \pm 0.14^\circ\text{C}$ であった。NDV の病原型は、PCR 産物の解離温度より推定することができ、NDV の病原型のスクリーニング法として優れていると考えられた。

NDV 遺伝子増幅法は、通常の培養によるウイルス分離法の代替法とはならないが、それぞれ異なった NDV 遺伝子を標的とした分子診断法を複数併用することでより優れた診断法となる。本研究で示した 3 種類の分子診断法は、いずれも迅速・高感度で安全性も高く経済的な NDV 株の検出・同定法であり、またそれぞれ検査室の設備に応じて使用可能であると同時に、将来において優れたルーチン検査法となる可能性も持っている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 助 教 授 大 橋 和 彦
副 査 助 教 授 迫 田 義 博

学 位 論 文 題 名

Genetic analysis and development of new diagnostic assays of Newcastle disease virus

(ニューカッスル病ウイルスの遺伝子解析と新規診断法の開発)

ニューカッスル病 (ND) はトリパラミクソウイルス 1 型のニューカッスル病ウイルス (NDV) によって引き起こされる伝播力の強い鶏の感染症である。近年でも世界各地で ND の発生が数多く報告されており、ND の迅速診断法の開発及び分子疫学調査は、将来的に起こる ND の発生を予防する上でも重要である。本研究では日本で分離された種々の NDV 株の系統樹解析を行い、さらに 3 種類の新規分子診断法の開発を行った。

NDV の nucleocapsid 蛋白 (NP) 遺伝子全長を用いた系統樹解析の結果、日本で分離された NDV 株 (1970 年代以前の古い株及び 1980 年代以降の新しい株) は、大きく 2 つのグループ、即ち病原性の株で構成されるグループと非病原性のグループ、に分類された。また制限酵素を用いた解析の結果、病原性 NDV の NP 遺伝子より増幅された PCR 産物は、*Pst*I により消化されないが、非病原性 NDV 由来の PCR 産物は消化されることが明らかとなった。このような *Pst*I を用いた RT-PCR-制限酵素断片長解析 (RFLP) は、NDV 株の病原型推定のための一次スクリーニング法として使用できることが示された。

次に簡便な遺伝子増幅法である、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の ND 診断への応用を検討した。NDV の fusion 蛋白 (F) 遺伝子を標的として設計したプライマー群を用いた LAMP 法により、通常の恒温水槽あるいはヒートブロックを使用するだけで、2 時間以内に臨床材料より NDV を特異的に検出することができた。さらにこの LAMP 法は nested PCR 法と同程度の感度・特異性を示した。以上の結果より、この LAMP 法が迅速・簡便で高感度、経済的な NDV 同定法であることが示された。

高感度で特異的な NDV の病原型推定法として、F 遺伝子を標的とした SYBR Green I を用いたリアルタイム RT-PCR 法と melting-curve 解析法を開発した。この方法では、PCR 産物の電気泳動による解析ステップを必要とせず、感度は通常 RT-PCR の 100 倍であり、感染鶏由来組織材料より直接 NDV を検出できた。この方法により NDV の病原型は、PCR 産物の解離温度より推定することができ、NDV の病原型のスクリーニング法として優れていると考えられた。

これら 3 種類の分子診断法は、いずれも迅速・高感度な NDV の検出・同定

法であり、優れた検査法であることが明らかとなった。よって、審査委員一同は、ファン・ハン・ミン君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。