

# 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 11 年度博士課程 入学 (進学)

氏 名 池上徹郎

指導教官名 吉川泰弘

論文題目 Study on the Establishment of Diagnostic Systems of Reston Ebola Virus Infection

Using Recombinant Nucleoprotein

(組換え核蛋白を用いたレストンエボラウイルス感染症の診断系確立のための研究)

エボラウイルス (EBOV) とマールブルグウイルス (MBGV) は非分節性、マイナス鎖の RNA ウイルスでモノネガウイルス目、フィロウイルス科に属している。EBOV には、ザイールエボラウイルス (EBO-Z)、スーダンエボラウイルス (EBO-S)、コートジボアールエボラウイルス (EBO-CI)、レストンエボラウイルス (EBO-R) の 4 種が存在する。EBO-Z、EBO-S、EBO-CI はアフリカ大陸の熱帯地域に出現し、ヒトに高い病原性を示す。EBO-R はフィリピンのカニクイザル繁殖、輸出施設に出現し、感染サルの一部がアメリカやイタリアに輸出され、流行を引き起こした。EBO-R 流行時に感染サルと接触した数人に抗体上昇が認められたが、発症に至った例はない。

フィロウイルスのゲノム構造は、3'-NP (核蛋白) -VP35 (P 蛋白) -VP40 (マトリックス蛋白) -GP (膜蛋白) -VP30 (転写に関与する核蛋白) -VP24 (カプシド形成に関与する膜関連蛋白) -L (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ蛋白) -5'であり、各遺伝子には保存された転写開始シグナルと転写停止シグナルが存在する。

第一章では、フィリピンで 1996 年 EBO-R 流行時に採材した感染カニクイザルの肝臓より抽出した全 RNA

を用いて RT-PCR を行い、産物をダイレクトシーケンスし、EBO-R の全ゲノム塩基配列（全長 18890 塩基）を決定した。エボラウイルスに共通した特徴として L に特異的な転写停止シグナル配列、2 カ所の遺伝子重複部位の存在、1 カ所の長い遺伝子間配列の存在、リーダーおよびトレーラー間の共通配列の存在、NP の長い 3'-非翻訳領域などが明らかとなった。

また、1989 年のペンシルバニア株と全塩基配列を比較した結果、遺伝子構造は完全に一致した。これらの特徴は EBO-Z と MBGV の塩基配列の比較によって提唱されたフィロウイルス科の基準を支持するものである。また、1989 年のレストン株、1989 年のペンシルバニア株、1992 年のイタリア株、1992 年のフィリピン株と、今回解析した 1996 年フィリピン株の GP のアミノ酸配列を比較した。その結果、同じ年の流行株間では GP のアミノ酸置換がみられなかったのに対し、異なる年の流行株間では 10 個以上のアミノ酸置換がみられた。EBOV は感染個体内で変異を起こしにくいことが報告されており、異なる年の EBO-R 株はそれぞれ別の自然宿主個体に由来する可能性が考えられた。

第二章では、同流行時に採材した 24 頭の EBO-R 自然感染カニクイザル（死亡サル 12 頭、安楽殺サル 12 頭）および 5 頭の EBO-R 非感染サルの肝臓、脾臓、腎臓、肺を病理組織学的に検索した。死亡サルでは、肝細胞での封入体形成、壊死、赤脾髄における重度のフィブリン沈着、白脾髄のリンパ球の減少、各臓器での血栓形成がみられた。安楽殺サルは種々の程度の組織所見を呈した。EBO-R 抗原は主に単球・マクロファージ (Mφ)、血管内皮細胞、線維芽細胞にみられた。今回検索した EBO-R 感染サルの血管内には組織学的に多くの単核球が認められ、これらの細胞は免疫染色により L1 抗原陽性の単球・Mφであることがわかった。L1 抗原陽性細胞は、死亡サルのほとんどで有意に増加していた。EBO-Z 実験感染モルモットでも肉芽腫性炎が起こることが報告されている。単球・Mφの増加は新たな EBO-R 感染を誘導し、ウイルスの増殖に有利に働くと考えられる。同流行時の EBO-R 感染サルでは、炎症性サイトカインの上昇が報告されている。これらのサイトカインによって血管内皮細胞の前凝固活性が上昇し、血栓形成が引き起こされると考えられる。

EBO-R の抗体保有状況は、優れた抗体検出系がないためにほとんど調べられていない。第三章 A では、EBO-R 抗体を高い感度と精度で検出するために、EBO-R または EBO-Z の組換え NP (rNP) を安定に発現する HeLa 細胞を用いた蛍光抗体法 (IFA) を作製した (EBO-R-IFA または EBO-Z-IFA)。EBO-R-rNP 免疫ウサギ血清 3 検体、EBO-R 自然感染カニクイザル血清 16 検体はすべて EBO-R-IFA、EBO-Z-IFA で陽性を示した。また、EBO-R-IFA では免疫ウサギ血清 1 検体、EBO-R 感染サル血清 11 検体が EBO-Z-IFA よりも高い抗体価を示した。一方、EBOV 流行のない施設由来のカニクイザル血清 96 検体はすべて EBO-R-IFA で陰性であった。以上より、EBO-R-IFA は高い感度と精度で EBO-R 抗体を検出することがわかった。

第三章 B では、EBO-R および EBO-Z の部分 rNP を用いた IgG-酵素免疫測定法 (ELISA) 作製し、EBOV 抗体の反応性を解析した。EBOV の NP は 739 アミノ酸より成るが、アミノ末端側半分は疎水性で抗原性に乏しく、カルボキシル末端側半分は親水性で抗原性に富むことがわかっている。そこで、EBO-R の部分 rNP として RΔC (アミノ酸残基 (aa) 360-739)、RΔ5 (aa 360-461)、RΔ6 (aa 451-551)、RΔ7 (aa 541-640)、RΔ8 (aa 631-739) を作製した。同様に、EBO-Z の部分 rNP として ZΔC、ZΔ5、ZΔ6、ZΔ7、ZΔ8 を作製した。EBO-R-rNP 免疫ウサギ血清 2 検体、EBO-Z-rNP 免疫ウサギ血清 4 検体、EBO-Z-rNP 免疫カニクイザル血清 (免疫後 7、30、73 日目)、EBO-R-IFA 陽性 EBO-R 感染カニクイザル血清 10 検体の、IgG-ELISA における各 EBO-R および EBO-Z の部分 rNP への反応性を調べた。すべての免疫ウサギ血清、EBO-Z-rNP 免疫サル血清 (73 日目) および、すべての EBO-R 感染サル血清は RΔC と ZΔC に反応した。このことから、ΔC を用いた IgG-ELISA は十分な感度を有することがわかった。EBO-R 感染サル血清 10 検体中 6 検体および 5 検体はそれぞれ RΔ6、RΔ8 に強く反応した。RΔ6 および RΔ8 に対する反応は EBO-R 抗体の偽陽性反応を除外する目安になると考えられる。一方、EBOV 非感染サル血清 72 検体はこの IgG-ELISA で反応しなかった。以上より、新しく作成した IgG-ELISA は精度が高く、特に IFA と併用することによって血清疫学に有用であると思われる。

第三章 C では、EBO-R-IFA および部分 rNP を用いた IgG-ELISA を用いて、1979 年から 1987 年の間に東南アジアより日本に輸入された捕獲野生カニクイザル血清 1,992 検体 (マレーシア由来 626 検体、インドネシア由来 667 検体、フィリピン由来 699 検体) を検索した。EBO-R-IFA による一次スクリーニングを行った結果、25 検体が陽性を示した。これらの IFA 陽性血清のうち、10 検体が IgG-ELISA で RΔC に反応した。RΔC に反応した血清の中で、3 検体は RΔ7 または ZΔ7 のみに、3 検体は RΔ5 および RΔ6 に、また、3 検体は RΔ8 のみに反応した。さらに VP40 や GP に対する抗体の有無を検査することにより EBO-R 特異抗体であることを確認できると思われる。今回の結果より、野生カニクイザルが EBO-R 抗体を保有する割合は非常に低いことが示唆された。

抗原捕捉 ELISA はエボラウイルス感染時の迅速診断に最も有効な手法のひとつである。第四章 A では、EBO-Z-rNP に対する単クローン抗体 (MAb) を作製し、EBO-Z、EBO-S、EBO-R の NP を効率よく検出できる抗原捕捉 ELISA を作製した。作製した 12 個の MAb のうち、3-3D、2-11G が抗原捕捉 ELISA で EBO-Z-rNP を高感度で検出した。3-3D は抗原捕捉 ELISA で EBO-R 感染カニクイザルの肝臓、脾臓、血清より EBO-R の NP 抗原を検出したが、2-11G は EBO-R の NP を検出しなかった。これより、3-3D が種交叉性 MAb として有用であることが示唆された。また、3-3D は EBO-Z の aa 648~673、EBO-R の aa 631~739、および EBO-S の aa 633~738 を認識していることがわかった。今回、限られた情報のため EBO-CI の rNP を作製することができなかった。3-3D を用いた抗原捕捉 ELISA は EBOV の 4 種のうち 3 種までを検出し、EBOV 感染症の

迅速診断に有効であることがわかった。

第四章 B では、EBO-R-rNP 特異的 MAb を作成し、EBO-R の NP を特異的に検出できる抗原捕捉 ELISA を作製した。作製した 32 個の MAb のうち、Res2-6C8 と Res2-1D8 が抗原捕捉 ELISA で高感度に EBO-R-rNP を検出した。また、Res2-6C8 と Res2-1D8 はそれぞれ aa 636~639、aa 636~643 を認識していることがわかった。このエピトープ配列は EBO-Z、EBO-S には存在しなかった。Res2-6C8 と Res2-1D8 は IFA で EBO-Z-rNP、EBO-S-NP と全く反応せず、抗原捕捉 ELISA でも EBO-Z-rNP を全く検出しなかった。一方、Res2-6C8 と Res2-1D8 は抗原捕捉 ELISA で EBO-R 感染カニクイザルの肝臓、脾臓、血清から EBO-R の NP 抗原を検出した。この Res2-6C8 および Res2-1D8 を用いた抗原捕捉 ELISA は EBO-R を特異的に検出し、3-3D を用いた抗原捕捉 ELISA と併用することによって EBO-R 感染を EBO-S、EBO-Z 感染と迅速に鑑別できることがわかった。