

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

池上 徹郎

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)

本論文は、エボラウイルスの組換え核蛋白を用い、エボラウイルスの鑑別診断系を確立したものである。エボラウイルス (EBOV) 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種が存在し、3'-NP (核蛋白) -VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'のゲノム構造をもつことが知られている。

第一章では、フィリピンで1996年に流行したEBO-Rの全ゲノム塩基配列 (全長18890塩基) とその遺伝子構造を世界ではじめて決定した。また、1989年のレストン株とペンシルバニア株、1992年のイタリア株とフィリピン株、1996年のフィリピン株のGPのアミノ酸配列を比較した。上記ウイルス株は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。以上より、各流行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、同流行における24頭のEBO-R感染カニクイザルの肝臓、脾臓、腎臓、肺を病理組織学的に検索した。これはサル類の自然感染例を体系的に病理分類した最初の報告である。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。EBO-R抗原は主に単球・マクロファージ (Mφ)、血管内皮細胞にみられた。EBO-R感染サルの血管内には多くのL1抗原陽性単核球 (単球・Mφ) が認められた。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た。

第三章Aでは、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-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、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EBO-R-IFAで高い抗体

価を示した。健常カニクイザル血清 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) を作製した。EBOV の NP は 739 アミノ酸より成り、C 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 R Δ C (アミノ酸残基 (aa) 360-739)、R Δ 5 (aa 360-461)、R Δ 6 (aa 451-551)、R Δ 7 (aa 541-640)、R Δ 8 (aa 631-739) を作製した。同様に、EBO-Z の部分 rNP として Z Δ C、Z Δ 5、Z Δ 6、Z Δ 7、Z Δ 8 を作製した。EBO-R 感染サル血清 10 検体は R Δ C と Z Δ C に反応し、 Δ C を用いた IgG-ELISA は十分な感度を有することがわかった。また、R Δ 6 および R Δ 8 に対して強い反応がみられ、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。第三章 C では、1979 年から 87 年のアジア捕獲野生カニクイザル血清 1,992 検体の EBO-R 抗体保有状況を検索した。EBO-R-IFA で 25 検体が陽性を示し、このうち 10 検体が IgG-ELISA で R Δ C に反応した。R Δ 6 または R Δ 8 に反応したのは 6 検体であった。以上より、野生カニクイザルでは 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。

第四章 A では、EBO-Z、EBO-S、EBO-R の NP 抗原を効率よく検出できる抗原捕捉 ELISA を作製した。EBO-Z-rNP に対して作製した単クローン抗体 (MAb) 12 個のうち、3-3D が抗原捕捉 ELISA で EBO-Z-rNP および EBO-R 感染カニクイザル材料中の EBO-R-NP を検出した。MAb 3-3D は EBO-Z の aa 648-673 を認識し、EBO-R の aa 631-739、および EBO-S の aa 633-738 にも反応することがわかった。さらに、第四章 B では、EBO-R の NP を特異的に検出できる抗原捕捉 ELISA を作製した。EBO-R-rNP に対して作製した 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 および EBO-R 感染カニクイザル材料中の EBO-R-NP を検出した。Res2-6C8 と Res2-1D8 はそれぞれ aa 636-639、aa 636-643 の EBO-R 特異的配列を認識していた。Res2-6C8、Res2-1D8、3-3D を併用することによって EBO-R 感染を EBO-S、EBO-Z 感染と迅速に鑑別することがわかった。

以上、本論文は人獣共通感染症でも特に重要なエボラウイルスに関する遺伝子解析、病理分類及び鑑別診断のための研究を進めたものであり、獣医学領域での貢献が多岐である。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。