

氏名	佐山 勇輔
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Establishment of serological diagnosis systems to determine prevalence and epidemiology of Reston ebolavirus infection in swine (ブタにおけるレストンエボラウイルス感染症の流行および疫学研究のための血清診断法の確立)
論文審査委員	主査 教授 押谷 仁 教授 石井 直人 教授 服部 俊夫

## 論文内容要旨

【背景】 エボラウイルスはモノネガウイルス目、フィロウイルス科に属するネガティブ一本鎖 RNA をもつウイルスであり、これまで 5 種のエボラウイルスが報告されている。レストンエボラウイルス(REBOV)を除くエボラウイルスは主にアフリカに分布し、ヒトを含む霊長類に高い病原性を有する。一方、REBOV は 1989 年にフィリピンからアメリカへ輸出され出血熱様症状を呈したカニクイザルで初めて同定され、その後数回フィリピン国内のカニクイザルおよびフィリピンから輸入されたカニクイザルで REBOV による出血熱が発生している。また REBOV はカニクイザルには他のエボラウイルスと同様に高い病原性を示すが、ヒトには病原性が低いと考えられている。2008 年フィリピンの 2 ヶ所の養豚施設のブタに致死性の呼吸器感染症が流行し、ブタ繁殖・呼吸障害ウイルス(PRRSV)が病原として同定されたが、一部のブタでは REBOV 感染も確認され、豚飼育施設内での REBOV の感染拡大が明らかになった。

【目的】 ブタの REBOV 感染症の血清診断法を確立し、2008 年の REBOV 感染症流行時の養豚施設内での感染実態を明らかにし、さらにフィリピン国内の異なる地域での REBOV のブタへの浸淫度を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】 1) REBOV 感染ブタリンパ節の RNA から、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)により REBOV の核タンパク質(NP)と糖タンパク質(GP)遺伝子を増幅し遺伝子配列を決定した。2) 組換えバキュロウイルスにより発現・精製した NP と GP を抗原とした IgG-ELISA、組換え NP もしくは GP 発現 HeLa 細胞を用いた間接蛍光抗体法(IFA)、REBOV-GP を外套した水泡性口内炎ウイルス(VSV)シュードタイプを用いた代替中和試験法(NT)を用いて、ブタの REBOV 感染症の血清学診断法を開発した。3) REBOV 感染が確認さ

れた2ヶ所の養豚施設で任意に採取された血清を各種血清学診断法で解析した。また、2010年にフィリピン北部ルソン島のターラックで採取されたブタ血清も同様に解析した。

【結果】1) 過去にカニクイザルから分離された REBOV と比較して、ブタから検出された REBOV は特に GP 遺伝子配列に変異が多く認められた。2) ブタの REBOV 感染症の各種血清診断法を確立した。3) 確立した血清学診断法で、2ヶ所の養豚施設の約70%のブタから IgG および中和抗体が検出された。また2010年にターラックで採取されたブタからは抗体が検出されなかった。

【考察】2008年の養豚施設のブタの PRRSV による呼吸器感染症流行時に REBOV も感染拡大したことが明らかとなった。REBOV 感染拡大に、PRRSV による呼吸器症状がどの程度寄与したかは不明である。しかし、PRRSV は感染ブタに免疫抑制を惹起することから、このことがブタの REBOV 感染拡大に寄与した可能性がある。また、異なる地域で採取されたブタ血清からは REBOV 抗体は検出されなかった。従ってブタにおける REBOV の大規模な感染はまれな事例であり、フィリピンにおける REBOV のブタへの浸淫度は低いと考えられる。また、各種血清診断法を併用することにより、診断の精度を高められることが示唆された。

【結語】2008年に発生したブタの REBOV 感染症は、サルから分離された REBOV とは遺伝的に異なる REBOV により、2ヶ所の養豚施設では共に広範囲な REBOV 感染が確認された。ブタの REBOV 感染症の各種血清診断法は、今後のフィリピンでのブタの REBOV 感染のモニタリングにも有用である。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 Establishment of serological diagnosis systems to determine prevalence  
and epidemiology of Reston ebolavirus infection in swine  
(ブタにおけるレストンエボラウイルス感染症の流行および疫学研究のための血清診断法の確立)

所属専攻・分野名 医科学 専攻 微生物学分野

学籍番号 \_\_\_\_\_ 氏名 佐山 勇輔

エボラウイルスはアフリカで繰り返し致死率の高い流行を起こしてきているウイルスである。これに対してフィリピンでの存在が確認されているレストンエボラウイルスはサルでは致死率の高い感染を起こすことがわかっているが、ヒトでの病原性は低いと考えられている。2008年にフィリピンにおいて世界で初めてブタでのレストンエボラウイルスの感染が確認された。しかし、ブタでのレストンエボラウイルスの疫学の詳細はフィリピン国内での診断系が確立していないことから不明のままである。本研究ではフィリピンのブタでのレストンエボラウイルスの疫学を明らかにする目的で行われた。まず、2008年にブタから見つかったウイルスの遺伝子解析を行い、これらのウイルスがこれまでサルで確認されたウイルスとは異なる Clade に属するウイルスであることを明らかにした。またフィリピンにおいて安全にしかも実行可能な抗体アッセイ系を確立した。アッセイ系としては発現させたウイルスタンパクを利用した、Immunoglobulin G-enzyme linked immunosorbent assay (IgG-ELISA)と蛍光抗体法、さらには Pseudovirus を用いた中和抗体法を新たに開発した。これらの系を用いて実際のブタサンプルで抗体検出を行った。この結果、2008年に流行の起きた農場のブタでの抗体陽性率は70%に上るが、その他のブタでは抗体を検出することができなかった。

フィリピンにおいて世界で初めて確認されたブタでのレストンエボラウイルスの流行をきっかけとして、どうウイルスに関する抗体のアッセイ系を確立し、実際のフィリピンのブタの検体でその有用性を検証した論文である。アッセイ系の確立にあたっては多くの技術・方法を駆使し研究を行った。またフィリピンで得られた知見は学術的にも有用なものであり、今後のフィリピンにおける疫学研究にも資するものであった。よって、本論文は博士の学位論文として合格と認める。