



Title	Studies on the mosquito-borne flavivirus serology useful for diagnosis of flavivirus infections [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田畑, 耕史郎
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第15521号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89943
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Koshiro_Tabata_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：田畑 耕史郎

審査委員	主査	特任教授	大橋	和彦
	副査	教授	好井	健太郎（長崎大学）
	副査	教授	澤	洋文
	副査	准教授	大場	靖子

学位論文題名

Studies on the mosquito-borne flavivirus serology useful for diagnosis of flavivirus infections

（蚊媒介性フラビウイルス感染症の新規血清診断法の確立に向けた研究）

病原性を有する蚊媒介性フラビウイルス（MBFV: mosquito-borne flavivirus）は、異なるウイルス種間で構造タンパク質のアミノ酸配列が高度に保存されている。そのため、これらの構造タンパク質を認識する抗体は、交差反応性を示す。これらの交差反応性抗体は、多くのフラビウイルスの構造タンパク質に結合するため、ウイルス種特異的な抗体を検出可能な血清診断法は未だ開発されていない。本研究では、MBFV と昆虫特異的フラビウイルス（ISFV: insect-specific flavivirus）間の抗原性を比較し、異なる抗原性を有するウイルスアミノ酸配列を用いて、交差反応性抗体の非特異的な結合を低減させるウイルス抗原の作出を試みた。

第一章では、分子系統学的に MBFV に近縁な lineage II ISFV (ISFV-II) と MBFV の構造タンパク質の抗原類似性を比較した。まず、全アミノ酸配列をもとに分子系統解析を実施した結果、ISFV は lineage I ISFV (ISFV-I) と ISFV-II の二つのクラスターに分類され、ISFV-II は更に ISFV-IIa と ISFV-IIb の二つに分かれた。次に、フラビウイルスで高度に保存されている構造タンパク質である precursor membrane 及び envelope (prME) のアミノ酸配列を基にして分子系統解析を実施した結果、ISFV-IIb とは異なり、ISFV-IIa は MBFV と同一のクレードに属することが明らかになった。In silico 解析で得られた上記の結果を確認するために、これら二種類の ISFV-II の抗原性をそれぞれのウイルスに対する抗血清を用いて評価した。これまでに所属研究室で蚊から分離した ISFV-IIa である Psorophora flavivirus (PSFV) と ISFV-IIb である Barkedji virus (BJV) をマウスに免疫することにより、抗血清を作出した。これらの抗血清は一部の MBFV（DENV: デングウイルス、ZIKV: ジカウイルス）

ス、JEV:日本脳炎ウイルスおよび WNV:ウエストナイルウイルス) の感染細胞抗原に対し結合活性を示し、更に前述の MBFV 感染に対し抗体依存性感染増強 (ADE) 活性を示した。また、PSFV 及び BJV に対する抗血清間で、MBFV 感染への ADE 活性が異なることも明らかにした。本結果から、ISFV-IIa である PSFV と ISFV-IIb である BJV が MBFV (DENV、ZIKV、JEV 及び WNV) と類似した抗原性の構造タンパク質を有している一方で、ISFV-IIa と ISFV-IIb では、系統的及び血清学的に抗原性が異なることが示唆された。

第二章では、MBFV で高度に保存されている fusion loop (FL) ドメインを抗原性の異なる FL ドメインに置換することで、交差反応を低減させるウイルスタンパク質の創出を試みた。本研究では、MBFV 及び ISFV-II の免疫により取得された 2 種類の抗 FL モノクローナル抗体を用いて、ISFV-I の FL ドメインが MBFV や ISFV-II と異なる抗原性を有することを明らかにした。また、その責任領域として L106、E107 及び W108 のアミノ酸を同定した。そこで、G106L、L107E 及び F108W のアミノ酸変異を導入した MBFV (DENV、ZIKV、JEV 及び WNV) の変異型ウイルス様粒子 (SVP: subviral particle) と野生型 SVP を作出し、SVP へのフラビウイルス感染血清の交差反応性と、SVP の免疫により誘導される抗体の交差反応性を評価した。その結果、野生型 SVP と比較して、変異型 SVP はフラビウイルス感染血清 (SVP と同種且つ同株のウイルス感染血清) の交差反応性を低減させると共に、ウイルス種特異的な結合を認めた。また、チャレンジフラビウイルス感染血清 (SVP と同種且つ異なる株のウイルス感染血清) においても、強いウイルス種特異的な結合シグナルを検出した。更に、変異型 SVP を免疫した血清中に、交差反応性が低下し ADE 活性が抑制された抗体が誘導され、また、これらの抗体が中和活性を有することを示した。本成果は、変異型 SVP を ELISA 抗原として用いることにより、交差反応性抗体の非特異的な結合を減少させ、ウイルス特異的な抗体を検出できる血清診断法に応用が可能であることを示した。更に、変異型 SVP 免疫血清は、野生型 SVP と比べ劇的に ADE 活性が抑制されており、一部に中和活性も認められた。以上の結果から、変異型 SVP は新規フラビウイルスワクチン抗原の候補になり得ることが期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者田畑耕史郎氏の学位論文は、北海道大学大学院国際感染症学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。