HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the antigenic characteristics of tick-borne flaviviruses and their application [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Chidumayo, Nozyechi Ngulube
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11515号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57166
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Nozyechi_Chidumayo_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：ノゼチ　グルベ チドゥマヨ

Name: Nozyechi Ngulube Chidumayo

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the antigenic characteristics of tick-borne flaviviruses and their application

（ダニ媒介性フラビウイルスの抗原性状の解析と応用）

The genus flavivirus contains several arthropod-borne zoonotic viruses which are the causative agents of encephalitis and hemorrhagic fevers. The tick-borne encephalitis serocomplex contains medically important flaviviruses namely; tick-borne encephalitis virus, Omsk hemorrhagic fever virus, Powassan virus, Alkhurma virus and Kyasanur forest disease virus. This thesis focuses on two members of the tick-borne encephalitis serocomplex; tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Omsk hemorrhagic fever virus (OHFV), the causative agents of tick-borne encephalitis (TBE) and Omsk hemorrhagic fever (OHF) respectively.

The envelope (E) protein of flaviviruses is the largest surface protein and is the major

target for neutralizing antibodies. Members of the tick-borne encephalitis serocomplex have a high E protein homology. As a result of this antigenic similarity, neutralizing antibodies against one virus have the potential to neutralize another virus within the serocomplex. The neutralizing potential is closely related to the degree of amino acid similarity of the E protein. Due to its immunogenic properties, the E protein is an important antigen in flavivirus immunodiagnositc research. This thesis investigated the applications of the E protein antigenicity in flavivirus prevention and diagnosis.

Vaccination is the most important method for preventing flavivirus infections; however, commercial vaccines against tick-borne flaviviruses are only available for TBEV. Due to the antigenic similarity of the E protein, it is feasible that the TBE vaccines can protect against other members in the serocomplex. In chapter 1, the antigenic cross-reactivity between TBEV and OHFV was assessed to evaluate the efficacy of the commercial TBE vaccines to cross-protect against OHF. Neutralization tests performed on sera from OHFV and TBEV-infected mice showed that neutralizing antibodies were cross-reactive. In mouse vaccination and challenge tests, the TBE vaccine provided 100% protection against OHFV infection. In addition, eighty-six percent of vaccinees seroconverted against OHFV following complete vaccination. These data suggest that the tick-borne encephalitis vaccine can prevent Omsk hemorrhagic fever virus infection.

Reliable surveillance of TBEV reservoirs and TBE cases is important for implementing effective disease prevention and control measures. Current diagnostic tests for TBEV

infections require high biosafety facilities for antigen preparation, and can cross-react with other flaviviruses. There is therefore a need to develop safe, inexpensive serodiagnostic tools with high specificity and sensitivity. Since the E protein is the major target for antibodies, recombinant E proteins could provide a cheaper alternative for producing TBE antigens for ELISA. Chapter 2 describes the development and evaluation of TBEV E-Fc proteins as antigens for TBEV serodiagnosis. A recombinant plasmid expressing TBEV E protein fused to the Fc region of rabbit IgG was expressed in mammalian cells. The E-Fc proteins were secreted as soluble homodimers, which retained reactivity with anti-TBEV and anti-rabbit IgG antibodies. The E-Fc proteins were used to develop an ELISA to detect TBEV antibodies in rodent and human sera. Compared with the neutralization test, the ELISA had over 90% sensitivity and specificity. In addition, the assay showed no cross-reactivity with Japanese encephalitis virus antibodies. These findings suggest that the E-Fc ELISA may be a useful tool for TBEV serodiagnosis.

日本語要約

フラビウイルスには、脳炎や出血などの重篤な臨床症状を引き起こす、節足動物媒介性の人獣共通感染症が属しており、その中でもダニ媒介性フラビウイルスであるダニ媒介性脳炎血清型群には、ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）やオムスク出血ウイルス(OHFV)といった医学・獣医学上、重要な病原体が含まれている。フラビウイルスのエンベロープ(E)蛋白は、ウイルス粒子表面を構成する蛋白であり、中和抗体の主要な標的となる。ダニ媒介性血清型群のウイルスは E 蛋白に高い相同性があり、中和抗体の交差反応性が指摘されている。また、その高い免疫原性から血清学的診断において重要な抗原蛋白として研究がされている。本研究では、この E 蛋白に着目してダニ媒介性フラビウイルスの予防法及び診断法に関する研究を行った。

ダニ媒介性フラビウイルスにおいて、一般に利用できるワクチンは TBEV に対してのみであり、他のウイルスに対しては開発が進んでいない。そこで、第一章では TBEV に対するワクチンが他のダニ媒介性フラビウイルス感染症に応用が可能か検討するため、TBEV と OHFV の抗原交差性の解析を行い、市販の TBEV ワクチンが OHFV 感染に対して有効であるか評価を行った。TBEV、OHFV にそれぞれ感染したマウスから採取した血清中の抗体は、中和試験において双方ともに高い交差反応性を示すことが示された。さらに TBEV ワクチンの接種により、マウスにおいては致死量の OHFV 感染から防御され、またヒトにおいては OHFV に対す中和抗体価の陽転が 86%のワクチン接種者において認められた。これらの成績により、TBEV ワクチンは OHFV の感染を予防する上で有効であることが示された。

現在の TBEV の診断においては、ウイルスを扱うための物理的封じ込め施設の必要性や、他のフラビウイルスに対する交差反応性が問題となっている。そこで、第 2 章では安全で特異性の高い診断法開発を目的として、IgG 抗体可変領域(Fc)を融合させた組み換え発現 E 蛋白(E-Fc)の診断用抗原としての応用を試みた。発現させた E-Fc 蛋白はホモ２量体で分泌されており、TBEV に対する抗体への反応性を有していた。E-Fc 蛋白を抗原とした ELISA 系を構築し、TBE 流行地で捕獲された野鼠及び TBEV 感染を疑われた患者の血清を用いて中和試験における判定結果と比較した所、90%以上の特異性及び敏感度を示した。さらに、日本脳炎患者血清とは全く交差反応を示さなかった。これらの成績により E-Fc 蛋白を利用した ELISA は TBEV の血清学的診断において有効に活用できる可能性が示された。