



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Surveillance of arbovirus infection in Zambia and characterization of the untranslated regions of insect-specific flaviviruses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	WASTIKA, Christida Estu
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	甲第14552号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81661
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Christida_E_Wastika_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学） 氏名：Christida Estu Wastika

審査委員	主査	教授	荻和	宏明
	副査	教授	澤	洋文
	副査	教授	東	秀明
	副査	講師	大場	靖子

学位論文題名

Surveillance of arbovirus infection in Zambia and characterization
of the untranslated regions of insect-specific flaviviruses
(ザンビアにおける蚊媒介性ウイルス感染症の調査、
および蚊特異的フラビウイルス非翻訳領域の解析)

蚊媒介性ウイルス性疾患である、黄熱、デング熱、ウエストナイル脳炎、ジカウイルス感染症は公衆衛生上重要な疾患である。上記の疾患の原因となる黄熱ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、ジカウイルスはフラビウイルスに属する。

フラビウイルスはエンベロープウイルスであり、そのゲノムは(+)鎖一本鎖RNAで10-11 kbの長さを有している。ゲノムには3つの構造タンパク質であるCapsid (C)、Pre-membrane/membrane (PrM/M)、Envelope (E)を、また非構造タンパク質として、7つのNon-structural protein (NS)である、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5をコードしている。ゲノムの両端には、5'-および3'-untranslated region (UTR)が存在する。フラビウイルス属はその宿主およびベクターから、蚊媒介性フラビウイルス (mosquito-borne flaviviruses : MBFVs)、ダニ媒介性ウイルス (tick-borne flaviviruses : TBFVs)、ベクター不明のウイルス (no-known vector flaviviruses : NKVFs)、昆虫特異的ウイルス (insect-specific flaviviruses : ISFVs)に分類される。ISFVsは蚊でのみ増殖が確認されているフラビウイルスで、ゲノム配列が系統的に他のフラビウイルスと離れたclassic insect-specific flavivirus (cISFVs)と、ゲノム配列がMBFVsに近縁ではあるが、脊椎動物での増殖が確認されていないdual-host affiliated insect-specific flavivirus (dISFVs)に分類される。

ザンビア共和国はアフリカ大陸の南部、サブサハラ地域に位置しており、乾燥地域と、湿地地域が存在しており、上記のフラビウイルスを媒介するネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)、ネッタイイエカ (*Culex quinquefasciatus*) 等の蚊が生息しており、フラビウイルスに感受性を有する野生動物も国立公園や狩猟許可地

域を中心として生息している。また Babaniyi らは北西部のザンビアの住民を対象とした血清疫学調査を実施した結果、黄熱ウイルス、ジカウイルスに対する抗体を検出したことを報告しており、ザンビア共和国においても、蚊がフラビウイルス感染症の原因となるウイルスを保有している可能性が示唆されている。

本学位論文の第一章では、ザンビア野生動物局（現在の観光・芸術省に属する国立公園、野生動物局）の承認の下で 2009-2010 年に採集した、ザンビアのヒヒ、バーベットモンキーを対象とし、黄熱ウイルス、ジカウイルスに対する中和抗体試験を用いた血清疫学調査を実施した。その結果、ジカウイルスに対する中和抗体は血清 96 検体中の 33 検体で確認された。また 33 検体の陽性検体の内 1 検体は黄熱ウイルスに対しても中和活性を認めた。さらに、血清検査を実施した個体の脾臓組織から抽出した RNA を用いて黄熱ウイルス、ジカウイルスのゲノムを RT-PCR 法で検索したが、陽性検体は検出されなかった。本研究により、ジカウイルスはザンビアのヒヒ、バーベットモンキーの間で感染環を有することが示唆された。

第二章では、ザンビアの各地で採集したメスの蚊から抽出した RNA を用いて、広範なフラビウイルスを検出できる primer を用いた RT-PCR 法を実施するとともに蚊由来の細胞を用いてウイルス分離を試みた結果、新規のフラビウイルスを単離した。単離したウイルスは次世代シーケンサーと rapid amplification cDNA ends (RACE 法)を用いて全ゲノム配列を決定した。その結果、単離されたウイルスは新規のバルケジウイルス株 (Barkedji virus : BJV、BJV Zambia 株と命名) と新規のフラビウイルス (Barkedji-like virus : BJLV と命名) であることを確認した。BJV Zambia 株の全ゲノム長は 10,899 塩基、BJLV の全ゲノム長は 10,855 塩基であった。全ゲノム配列を用いた系統発生解析の結果、これらの BJV Zambia 株および BJLV は dISFVs に属しており、さらに系統分類上、ヒトに病原性を有する MBFVs の間に挟まれていたが、哺乳類動物、鳥由来の複数の細胞株では増殖せず、蚊由来細胞でのみ増殖した。

第三章では、単離した BJV Zambia 株および BJLV の UTRs について、オーストラリアのウイーン大学の Michael T. Wolfinger 教授との共同研究により、その RNA 高次構造を解析することを試みた。MBFVs において、フラビウイルスゲノム UTRs の特徴的な RNA 構造や、3'-UTRs から産生される subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) がウイルス複製に重要であることから、dISFV ゲノムにおける UTR の解析を実施した。その結果、BJV および BJLV は 5'-UTR に stem-loop (SL) 構造を有していること、3'-UTRs に exoribonuclease-resistant RNA (xrRNA) 構造、SL-III 構造、dumbbell (DB) 構造、terminal 3'SL 構造を有していること、さらに、両ウイルスの xrRNA 構造は RNA 分解酵素である exoribonuclease 1 (Xrn1) に耐性であり、sfRNA の産生に寄与することが示唆された。

本研究で得られた成果は、フラビウイルスに関する疫学のおよび基礎的知見を提供した。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Christida Estu Wastika 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。