



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on serological diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Pongombo, Boniface Lombe; ポンゴンボ, ボニフェイス ロンベ
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	甲第15048号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86010
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Boniface_Lombe_PONGOMBO_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：Boniface Lombe PONGOMBO

審査委員	主査 教授	迫田 義博
	副査 教授	鈴木 定彦
	副査 教授	澤 洋文
	副査 教授	高田 礼人

学位論文題名

Study on serological diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever

(クリミア・コンゴ出血熱の血清診断法に関する研究)

クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）はダニ媒介性の人獣共通感染症であり、重篤な出血熱を主徴とする。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV）はアジア・アフリカ地域に広く分布していることが知られている。本ウイルスはダニおよび動物の間で維持されていると考えられるため、動物の抗体保有率の調査はCCHFの公衆衛生学的リスクの指標として重要である。しかし、血清疫学調査による感染状況調査は殆どの流行地域で不十分である。理由として、現在使用されてる市販のキットは価格が非常に高い事に加えヒト抗体の検出用として開発されたものである事および感染性のウイルスを用いた中和試験などは高度な生物学的封じ込め施設が必要となる事などが挙げられる。よって、CCHFVに対する特異抗体を高感度で検出することが出来る安価で簡便な血清診断法の開発が求められている。

第1章では、ヒト由来培養細胞に発現させたCCHFVの核蛋白質（NP）を簡便に精製する手法を確立し、ヒトおよび動物血清中のCCHFV特異IgG抗体を検出するenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法に用いる抗原としての有用性を評価した。CCHFV NPはウイルス粒子内および感染細胞内に大量に存在する主要抗原の一つであり、異なるCCHFV株間で抗原的に保存性が高い蛋白質である。まず、CCHFV NP遺伝子の翻訳領域cDNAを蛋白質発現プラスミドにクローニングし、ヒト腎臓由来293T細胞に導入した。次に、その細胞溶解液を塩化セシウム密度勾配超遠心によって分画し、精製NPを得た。また、電子顕微鏡観察によってNPの構造を確認した。さらに、この精製NPを抗原として用いたELISA法を確立した。本法は、酵素標識した2次抗体を変える事で様々な動物種に対応できるため、市販のELISAキットより汎用性が高い。CCHFV感染ヒト血清を用いて感度と特異性を調べたところ、本研究で確立した手法は市販のキットと同程度以上の性能を示す事が

確認された。これらの成績は、確立された ELISA 法が様々な動物種を対象とした血清疫学調査に有用である事を示している。

第 2 章では、CCHFV NP 分子上の抗原領域の特定を試みた。同じナイロウイルス科に属するナイロビ羊熱ウイルス (NSDV) の NP と CCHFV NP の間で複数のキメラ蛋白質を作出し、それぞれのウイルスに対する抗血清あるいは感染動物・ヒト血清を用いて反応性を比較した結果、CCHFV NP と NSDV に対する抗体は異なるキメラ蛋白質を認識する事が分かった。CCHFV NP に対するモノクローナル抗体を 12 クローン作出し、キメラ NP に対する反応性によって分類したところ、CCHFV NP 上に少なくとも 4 つの抗原領域の存在が示唆された。これらのモノクローナル抗体のうち 5 クローンは CCHFV NP のアミノ酸 240-320 番目、2 クローンは 320-400 番目の領域中に存在するエピトープを認識することが示唆された。CCHFV NP のアミノ酸配列を基にした合成ペプチドを抗原として用いた ELISA によって、複数のエピトープ配列が同定された。そのうちの幾つかは、NSDV 等を含めたナイロウイルス間で共通であることが示唆された。今後、CCHFV NP 上のエピトープの詳細な解析によって、より特異性の高い抗体検出法の開発が期待される。

本研究では、CCHFV 感染の血清診断法の確立とその改良を目指した基礎研究を行った。確立した ELISA 法は、ヒトおよび動物における CCHFV 感染状況の把握のためのサーベイランスに活用することが可能である。また、抗原領域解析で得られた結果は CCHFV 特異抗体検出法の感度と特性の向上に有益な情報を提供した。さらに、作出したモノクローナル抗体はイムノクロマト法を用いた迅速診断法に活用できる。これらの成果は、今後の CCHF 対策に貢献するものと期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 ポンゴンボ ボニフェイス ロンベ 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。