



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15521号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89943
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koshiro_Tabata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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：田畑 耕史郎
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

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 と MBFV の構造タンパク質の抗原類似性と比較した。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、lineage II ISFV は lineage IIa ISFV と lineage IIb ISFV の二つのクラスターに分類された。更に、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の precursor membrane 及び envelope (prME) のアミノ酸配列をもとに分子系統解析を実施した結果、lineage IIb ISFV とは異なり、lineage IIa ISFV は MBFV と同一のクレードに属することが明らかになった。続いて、これら二種類の lineage II ISFV 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分離した lineage IIa ISFV である Psorophora flavivirus (PSFV) と lineage IIb ISFV 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、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、更にフラビウイルス感染症で問題となっている抗体依存性感染増強 (ADE) 活性をそれぞれの MBFV に対して有していることを示した。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、lineage IIa ISFVであるPSFVとlineage IIb ISFV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、lineage IIa ISFVとlineage IIb ISFVでは、系統学的及び血清学的に抗原性が異なることが示唆された。本研究により、MBFV感染歴のある患者が、ISFV感染蚊に吸血されることにより、MBFVに対する抗体が再活性化され、更にその抗体がADEを誘導する可能性が示唆された。しかしながら、ISFVが感染した蚊の吸血により吸血対象へウイルスが導入されるかについては不明であるため今後、更なる研究が必要である。

第二章では、MBFV、lineage II ISFV及びlineage I ISFVのfusion loop（FL）ドメインの抗原性を利用した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。FLドメインは、異なるフラビウイルス種間で高度に保存されており、抗FL抗体は多くのフラビウイルスに交差反応することが報告されている。本研究では、MBFV及びlineage II ISFV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（4G2及び6E6）を用いて、lineage I ISFVのFLドメインがMBFVやlineage II ISFVと異なる抗原性を有することを明らかにした。また、その異なる抗原性の責任領域として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、交差反応性の低下と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。しかしながら、交差反応エピトープはFLドメイン以外にも存在する。そのため、今後、更なる交差エピトープを抗原性が異なるlineage I ISFVに置換することにより、血清診断法及びワクチン開発に応用可能なウイルス抗原の作出を目指す。