



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the viral proliferation and pathogenicity of flaviviruses isolated from mosquitoes and wild animals in Zambia [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小林, 広子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16476号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95517
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroko_Kobayashi_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：小林 広子
Name Hiroko Kobayashi

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

**Studies on the viral proliferation and pathogenicity of flaviviruses
isolated from mosquitoes and wild animals in Zambia**

（ザンビアの蚊および野生動物から単離された
フラビウイルスの増殖機構と病原性解析）

蚊は様々な病原体をヒトへ媒介することにより、現在も世界各地で多くの感染症を起こしていることから、最もヒトに有害な生物であると考えられている。昨今の地球温暖化による蚊の生息域の拡大から、今まで熱帯、亜熱帯地域でのみ発生が確認されていた感染症が、新たな地域で発生するリスクが高まり、蚊媒介ウイルス感染症は、公衆衛生学的に重要な問題となっている。

ウエストナイルウイルス（WNV）は、デングウイルス、ジカウイルス、日本脳炎ウイルス等とともに蚊媒介性のフラビウイルス科オルソフラビウイルス属の RNA ウイルスに分類される。WNV は 1937 年にウガンダで発見されて以来、現在では南極大陸を除く全ての大陸で流行しており、特に病原性の高い lineage 1a と 2 の WNV が近年公衆衛生学上問題となっている。WNV は約 80% の感染症例でヒトに不顕性感染を起こし、残りの 20% は発症し、熱性疾患や発疹、消化器症状を呈する。脳炎・髄膜炎等の重篤な症状を発症する患者は感染者のうち 1% 未満で、重症患者の死亡率は 3～15% である。WNV の病原性は、C57BL/6 マウスを含むマウスモデルを用いて解析されている。現在ヒト WNV 感染症に有効なワクチン、及び特異的な治療法は確立されておらず、WNV の増殖性と病原性に関する基礎的知見の蓄積は、WNV 感染症対策に必須である。WNV は広い宿主域を有しており、自然界では蚊と鳥類で感染環を形成するが、他にもヒト、爬虫類、ウマ、その他様々な野生動物が蚊の刺咬により感染する。

WNV はワニに感染して pix と呼ばれる発疹や神経学的症状を生じさせ、ワニ皮革産業に打撃を与えている。これまでに、アメリカ、メキシコ、イスラエル等で、ワニから WNV が検出されているが、自然感染したワニから単離された WNV 株の全ゲノム解析、及び性状解析の報告はない。ザンビア共和国では、2016 年に採集された蚊のサンプルから初めて lineage 2 に属する WNV (Zmq16m11 株 : Zmq16) が単離され、さらに、2019 年にはザンビア南部のワニ養殖場において神経症状を示した個体から Zmq16 とは異なる lineage 1a に属する WNV が検出さ

れた。

本研究では、第一章で、ザンビアの養殖ワニから検出された新規 WNV 株を対象に、ウイルス分離と各種培養細胞を用いたウイルス性状解析を実施した。第二章では、ワニからの分離株に加えて、以前にザンビアの蚊から分離された Zmq16 株に関して、実験室株と比較して感染モデルマウスにおける病原性解析を実施し、ザンビアの動物から単離された WNV の増殖性と病原性を解析することを目的とした。

第一章では、以前 WNV が検出されたザンビアの養殖ワニから、WNV (Croc110/2019/1/ZM : Croc110) を分離し、その全ゲノム配列を同定した。次に、Croc110 の培養細胞内での増殖性を、Zmq16、及び実験室株である高病原性株 (NY99) と低病原性株 (Eg101) と比較して、複数の細胞株で検討した。その結果、蚊由来 C6/36 細胞では、Croc110 は Eg101 と比べて、2, 3 dpi で有意に増殖性が高いこと、NY99 や Zmq16 と同等の増殖性を有することを明らかにした。また、哺乳類動物由来非神経細胞である Vero 細胞、及び哺乳類動物神経由来細胞株である NA 細胞におけるウイルス増殖性は、上記の株間で同程度であること、SH-SY5Y 細胞では Eg101 と比較して、1 dpi で有意に増殖性が高いことを明らかにした。一方、培養細胞におけるプラークサイズを比較した結果、NA 細胞では Croc110 は Eg101 より有意に小さいプラークサイズを示し、NY99 と Zmq16 株と同程度のプラークサイズを示した。Vero 細胞と SH-SY5Y 細胞においては、Croc110 は他の 3 株と比較して有意にプラークサイズが小さかった。

第二章では、ワニ由来 Croc110 と蚊由来 Zmq16 のマウス (C57BL/6) における病原性と増殖性を NY99、及び Eg101 と比較解析した。ウイルス接種経路として、脳内接種、腹腔内接種、耳介からの皮内接種を実施した。その結果、脳内接種した際には、Croc110 感染マウスの 70%程度が神経学的症状を呈し、死亡率は Eg101 感染マウスより有意に低く、NY99、及び Zmq16 感染マウスと同等であった。しかし、皮内、及び腹腔内接種では、Croc110 感染マウスの死亡率は、低病原性株の Eg101 と同程度であり、NY99、及び Zmq16 に比べて有意に低いことが明らかになった。Zmq16 は脳内接種と腹腔内接種において NY99 と同程度の死亡率と臨床症状を呈し、皮内接種では NY99 に比べて有意に高い死亡率を呈した。マウスにおける接種実験において、Croc110 は末梢接種において Eg101 と同程度の低い病原性、脳内接種では NY99 と同程度の病原性を示した。また、Zmq16 は脳内接種と腹腔内接種では NY99 と同等の高病原性であり、皮内接種では NY99 より高い病原性を示すことがわかった。この結果に一致して、Croc110 皮内接種後の感染マウス脳内、及び末梢組織内におけるウイルス増殖は、Zmq16、及び NY99 感染マウスと比較して有意に低かった。本研究により、Croc110 は、末梢接種したマウスにおいて各種臓器での増殖性、及び神経侵襲性が低く、lineage 2 に属する Zmq16 とは異なる病原性を示すことが明らかとなった。

本研究では、ザンビアのワニから lineage 1a に属する WNV を新たに分離し、その全ゲノム配列を同定した。さらに、ワニ、及び蚊から検出された、異なる 2 株の細胞での増殖性、感染マウスでの病原性と増殖性を解析した。本研究は、自然感染ワニから分離された WNV 株に関する初めての性状解析である。本研究で分離、解析をした Croc110 は、哺乳類動物由来培養細胞において他の株と比較してプラークサイズが小さく、マウスへの末梢接種で低い病原性を示し、各種臓器において増殖性が他の株よりも低かった。対して、Zmq16 は、細胞での増殖性が他の株と同程度で、末梢接種におけるマウスでの病原性は NY99 と同程度以上であり、各種臓器での高い増殖性を示した。また、本研究では、マウスへの WNV 接種において脳内接種、腹腔内接種、耳介の皮膚を介した皮内接種を検討した。耳介を介した皮内接種は腹腔内接種同様全身性の WNV 感染を確立した。接種部位の採材の容易さを加味すると、耳介を介した皮内

接種は、既報で汎用されている foodpad を介した皮内接種よりも、WNV の皮内接種に有用であると考えられた。

以上、本研究は、ザンビアで単離された異なる lineage に属する 2 つの WNV 株に関して、培養細胞やマウス体内での増殖性とマウスでの病原性を解析した。先行研究では、ELISA を用いた血清学的調査により、ザンビアのヒト血清中に抗 WNV 抗体が検出されたことが報告されている。本研究により、ザンビアには、隣接する地域において異なる lineage と病原性を有する WNV が少なくとも 2 種類存在することが示された。そのため、ザンビアにおけるヒトや動物を対象として WNV の感染状況のサーベイランスを継続することが必要であると考えられた。