

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏 名	加 藤 文 博
論文題目	Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines （ フィリピンにおけるカニクイザルの都市型デングウイルス自然感染）		
（論文内容の要旨）			
<p>デングウイルス（DENV）は 1 から 4 型の 4 血清型からなるフラビウイルス属のウイルスであり、カ媒介性疾患であるデング熱・デング出血熱の病原ウイルスである。DENV 感染症は熱帯・亜熱帯地域を中心に 100 ヶ国以上で流行し、毎年世界中で約 1 億人の患者が発生していると推定されている。ウイルスはヒトとカの間で感染環を形成している（都市型 DENV）が、非ヒト霊長類においても抗 DENV 抗体や DENV 遺伝子の検出、ウイルスの分離が報告されている（森林型 DENV）。都市型と森林型の DENV は系統学的に明らかに異なり、それぞれの宿主に適応したウイルスであると考えられる。しかし、非ヒト霊長類でのこれら DENV 感染状況の調査は不十分である。本研究では非ヒト霊長類での DENV 感染の潜在的役割を理解するために、非ヒト霊長類における DENV 感染状況を調査した。</p> <p>本研究で供試した血漿試料は、2010 年にフィリピンにあるカニクイザル飼育繁殖施設で 100 頭の個体から採取した。これら血漿試料を過去の DENV 感染を示す IgG 抗体と直近の感染を示す IgM 抗体の捕捉 ELISA により検査したところ、100 検体中 19 検体が IgG 抗体陽性、21 検体が IgM 抗体陽性であり 5 検体が IgG 抗体と IgM 抗体の両方が陽性であった。ELISA 法は抗 DENV 抗体のみならず他のフラビウイルスに対する抗体も検出する可能性があるため、抗体捕捉 ELISA で陽性だった 35 検体について、より DENV 特異的に抗体抗原反応を検出するプラーク減少中和試験（PRNT）を行った所、35 検体中 9 検体が抗 DENV 抗体陽性と判定された。そのうち、3 検体が抗 DENV-1、5 検体が抗 DENV-2 抗体、1 検体が抗 DENV-3 抗体陽性であった。次に、これら抗 DENV 抗体を有する血漿から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いウイルス遺伝子の増幅を試みた。PCR 法のプライマーとして、DENV が宿主細胞へと結合するために必要なエンベロープタンパクをコードする E 遺伝子領域と、ウイルス複製に関与し、塩基配列の保存性が高い NS1 蛋白をコードする NS1 遺伝子領域を検出するユニバーサルプライマーを用いた。その結果、PRNT 陽性 9 検体のうち、1 検体から NS1 遺伝子と E 遺伝子が、別の 1 検体から NS1 遺伝子のみが増幅された。増幅された遺伝子の塩基配列解析を行い、それぞれ得られた塩基配列情報をもとに maximum-likelihood 法により系統解析を行った所、増幅された遺伝子はいずれも都市型 DENV-2 型の遺伝子配列であり、サンプルを採取した 2010 年にアジア地域で流行しヒトから分離された株と近似していた。即ち、本研究で用いたカニクイザルに感染していた DENV は、従来非ヒト霊長類から分離されてきた森林型 DENV 株とは異なるものであり、都市型の DENV であった。以上のことより、従来までは、森林型 DENV は新興感染症として非ヒト霊長類からカを介しヒトへの感染が考えられてきたが、都市型 DENV もヒトから非ヒト霊長類へと spill back することが示唆された。これにより非ヒト霊長類が都市型 DENV のリザーバーとなりうる可能性にも留意することが必要であると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>熱帯病のデング熱・デング出血熱の病原体であるデングウイルス (DENV) はヒトとカの間で循環し都市部で流行する (都市型 DENV)。一方、非ヒト霊長類において都市型 DENV と異なる DENV 感染の証拠が報告されており、もう一つの感染環が森林部に存在すると推定されている (森林型 DENV)。森林型 DENV はデング感染症患者からも分離されていることから、新興感染症として留意する必要があるものの、森林環境中の DENV 自然史には不明瞭な点が多い。申請者はフィリピンにある飼育繁殖施設のカニクイザル計 100 頭から採取された血漿を用い、DENV 感染状況調査と感染ウイルスの同定を行った。ELISA 法とプラーク減少中和試験を併用した血清学的診断により、9 頭のカニクイザルの DENV 感染を明らかにした。試料からのウイルス分離は不成功であったが、PCR 法によりウイルス遺伝子断片を増幅した。系統解析を行った結果、2 頭のカニクイザルが、血液採取当時に東南アジア近隣諸国で流行していた株と近縁な都市型 DENV に感染していたことを明らかにした。本研究で、非ヒト霊長類が都市型 DENV に自然感染することを示し、非ヒト霊長類が都市型 DENV 循環の維持に寄与する宿主の一つになりうることを示唆した。</p> <p>以上の研究は、都市型 DENV における非ヒト霊長類の潜在的役割を明らかにし、DENV の生活環解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 2 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>