

氏名(国籍)	KASANGA, Christopher Jacob (タンザニア連合共和国)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第252号		
学位授与年月日	平成20年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Molecular Biological Studies on Emerging Infectious Bursal Disease Virus (新興性伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスに関する分子生物学的研究)		
審査委員	主査	岐阜大学	教授 福士秀人
	副査	帯広畜産大学	教授 猪熊 壽
	副査	岩手大学	教授 品川邦汎
	副査	東京農工大学	教授 本多英一
	副査	岐阜大学	教授 石黒直隆
	副査	鳥取大学	教授 山口剛士

論文の内容の要旨

伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) ウイルス (IBDV) は二分節二本鎖RNAをウイルスゲノムとし、ビルナウイルス科アピビルナウイルス属に分類される。IBDV血清型1は主に若齢鶏に免疫抑制を惹起し、一般に致死率は低い。1980年代には高い致死性を示す超強毒型IBDV (VV-IBDV) が突然出現した。しかしVV-IBDV出現に至るIBDVの進化経路や致死病的病原性決定因子は未だ解明されていない。本研究ではIBDVの分子疫学、分子系統解析による遺伝的多様性と進化および分子生物学的性状解析を行った。

第1章では、2001年から2004年にタンザニアのIBD罹患鶏より分離したIBDV14株についてVP2可変領域 (VP2-HVR) の塩基配列を解読し、遺伝子型別を行った。タンザニア分離株はいずれも強毒型に属し、アフリカ型強毒株に高い塩基配列相同性を示す集団およびヨーロッパ/アジア強毒株に高い塩基配列相同性を示す集団の2つの遺伝子型に分けられた。タンザニアにおけるアフリカ型およびヨーロッパ/アジア型VV-IBDVの存在が明らかになった。

第2章では、野鳥におけるIBDV血清型1の分布について血清疫学および分子疫学的検索を実施した。タンザニアおよびザンビアで採取した健康な野生または放し飼いのホロホロチョウ21羽およびハト20羽についてウイルス中和抗体の検出およびファブリキウス嚢組織からのVP2-HVRの検出と塩基配列の解析を行った。タンザニアのホロホロチョウ2羽はRT-PCRおよびVNT陽性で、タンザニア由来野生ハト1羽はRT-PCRのみ陽性であった。ホロホロチョウ1羽およびハトから検出されたIBDVの遺伝子型は、ヨーロッパ/アジア型VV-IBDV

であり、他のホロホロチョウから検出されたIBDVは従来型であった。IBDVの疫学および変異体出現における野鳥の果たす役割の重要性を示唆した。

第3章では、アフリカ型IBDVのRT-PCRによる検出と増幅断片の制限酵素切断像多型解析による型別法を確立した。6種の制限酵素Aat I, Ban III, Bsp MI, Ssp I, Sac IおよびNco IがVP2-HVRの塩基配列に基づく6遺伝子型の型別に有用であることが示された。塩基配列の解読が実施できない地域での本法の有用性を示した。

第4章ではアフリカ型VV-IBDV出現に至る進化経路および分子生物学的特徴を明らかにするため、タンザニアKMRG-48株の分節Aおよび分節Bの全塩基配列を解読した。KMRG-48株分節AのVP5, VP2, VP4およびVP3コード領域の塩基配列および推定アミノ酸配列により分子系統樹を作成したところ、いずれの系統樹も同様の樹形を示したが、分節BにコードされるVP1の配列で作成した分子系統樹はこれらと著しく異なる樹形を示し、VV-IBDVの出現に遺伝子再集合が関与している可能性が示唆された。

第5章では、アフリカ型超強毒株10株について塩基配列を解読し、ゲノム分節A, B間での遺伝子再集合による新興ウイルス出現の可能性を検討した。その結果、ザンビア分離株は分節AがVV-IBDVに、一方分節Bが従来型弱毒ウイルスに由来する遺伝子再集合ウイルスであることが示唆された。従来型弱毒株との遺伝子再集合を示唆するIBDV野外分離株の発見は、IBDV弱毒生ワクチンの使用に際し、ワクチンが遺伝子再集合による新興ウイルス出現の遺伝子供与体となる危険性を示唆している。

本研究は、新興性IBDVの性状を明らかにし、アフリカ型超強毒IBDVの存在およびアフリカにおける野外での遺伝子再集合を明らかにした。放し飼いのホロホロチョウおよび野生ハトからのIBDVゲノムRNA検出は、IBDVの疫学における野鳥の果たす役割の重要性を示した。また、野外におけるIBDVの疫学的検索および迅速な同定に有用なIBDV血清型1の制限酵素切断像による型別法を確立した。野外材料からの遺伝子再集合ウイルスおよびアフリカ型超強毒IBDVの発見から新興性IBDV出現に対する適切な制御方法確立の必要性を示した。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、鶏に高い致死性を示す超強毒型伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (VV-IBDV) 血清型1の分子疫学、分子系統解析による遺伝的多様性と進化および分子生物学的性状について解析を行った。

第1章では、2001年から2004年にタンザニアのIBD罹患鶏より分離したIBDV14株についてVP2可変領域 (VP2-HVR) の塩基配列を解読し、遺伝子型別を行った。タンザニア分離株はアフリカ型強毒株およびヨーロッパ/アジア強毒株の2遺伝子型に分けられた。タンザニアにおける複数の遺伝子型VV-IBDVを明らかにした。

第2章では、タンザニアおよびザンビアのホロホロチョウおよびハトについて中和抗体およびVP2-HVRの検出と塩基配列解析を行った。ホロホロチョウ1羽およびハトから検出されたIBDVはヨーロッパ/アジア型VV-IBDVであり、他のホロホロチョウから検出されたIBDVは従来型であった。IBDVの疫学および変異体出現における野鳥の役割の重要性を示唆した。

第3章では、アフリカ型IBDVのRT-PCRによる検出と増幅断片の制限酵素切断像多型解析による型別法を確立した。6種の制限酵素がVP2-HVRの塩基配列に基づく遺伝子型別に有用であることを明らかにし、塩基配列の解読が実施できない地域での本法の有用性を示した。

第4章ではタンザニアKMRG-48株の分節Aおよび分節Bの全塩基配列を解読した。KMRG-48株分節AおよびBの塩基配列および推定アミノ酸配列により、VV-IBDVの出現に遺伝子再集合が関与している可能性を示唆した。

第5章では、アフリカ型超強毒株10株について塩基配列を解読した結果、ザンビア分離KZC-104株は分節AがVV-IBDVに、分節Bが従来型弱毒ウイルスに由来する遺伝子再集合ウイルスであった。IBDV弱毒生ワクチンが遺伝子再集合による新興ウイルス出現の遺伝子供与体となる危険性を示した。

本研究においてアフリカ型超強毒IBDVの存在、野外での遺伝子再集合、IBDVの疫学における野鳥の果たす役割の重要性、野外におけるIBDVの制限酵素切断像による型別法を確立した。野外材料からの遺伝子再集合ウイルスおよびアフリカ型超強毒IBDVの発見は、新興性IBDV出現に対する適切な制御方法確立の必要性を示している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目： Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV): diversity of very virulent IBDV in Tanzania
著 者 名： Kasanga, C.J., Yamaguchi, T., Wambura, P.N., Maeda-Machang'u, A.D., Ohya, K. and Fukushi, H.
学術雑誌名： Archives of Virology
巻・号・頁・発行年： 152 (4): 783 - 790, 2007

既発表学術論文

- 1) 題 目： A practical tissue sampling method using ordinary paper for molecular detection of infectious bursal disease virus RNA by RT-PCR
著 者 名： Maw, M.T., Yamaguchi, T., Kasanga, C.J., Terasaki, K. and Fukushi, H.
学術雑誌名： Avian Diseases
巻・号・頁・発行年： 50 (4): 556 - 560, 2006
- 2) 題 目： Nucleotide sequence analysis of VP2 hypervariable domain of infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to 2004
著 者 名： Yamaguchi, T., Kasanga, C.J., Terasaki, K., Maw, M.T., Ohya, K. and Fukushi, H.
学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年： 69 (7): 733 - 738, 2007