

氏 名 (国籍)	カルロ ダンテ ナティヴィダッド (フィリピン)		
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4704 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Development of Control Strategies for White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Penaeid Shrimp (エビホワイトスポットシンドロームウイルス感染に対する制御手法の開発)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学教授	農学博士	松 本 宏
副 査	筑波大学准教授	農学博士	青 柳 秀 紀
副 査	筑波大学講師	博士 (農学)	野 村 名可男

論 文 の 内 容 の 要 旨

ホワイトスポットシンドロームウイルス (WSSV) は、最も病原性・感染性が強いクルマエビ類に対するウイルスとして広く知られており、養殖産業に対する被害は数百万米ドルに及ぶ。いったん感染すると数日中に養殖場全体に感染が広がり、処置が困難である。実験動物を用いた試験では感染後 3～12 日以内に 100 パーセントの致死率に至ることが報告されている。現在多くの養殖場で行なわれている対処法は、早期にウイルスを検出し感染源をいち早く養殖場内から排除することである。本論文第 2 章では、エビ養殖産業に多大な被害を引き起こしている二種のウイルス (WSSV：ホワイトスポットシンドロームウイルス、MBV：モノドンバキュロウイルス) の同時検出法の開発について報告した。本研究により、1 本のチューブ内で 1 ステップのみの PCR により、両ウイルスを微量 (～15 ユニツコピー) から検出できる方法が開発された。養殖されているエビ体内における迅速で確実なウイルス検出法であり、エビ養殖現場、での応用が期待される。第 3 章では、土壌中の病原性ウイルスを検出するための特異的 DNA プローブと、それを用いた nested PCR 法の開発を報告した。開発された方法を用いることにより、土壌中の極微量のウイルス粒子 (2 コピー～) を検出することに成功した。また、本手法により、WSSV は土壌内で少なくとも 10 ヶ月は軽い熱処理を施しても安定した状態で存在することも明らかとなった。本研究の成果は、WSSV の生態系における分布、病原性を調査していく上で非常に有力な手段となると考えられる。WSSV の対処法に関しては、感染後の効果的な手段がいまだ存在しないため、多くの研究開発は感染をいかにして防ぐか、に焦点が当てられてきた。そこで、免疫賦活剤によるエビ非特異的免疫系の活性化、抗体を用いたウイルスの中和、ウイルスタンパクを用いたワクチン開発などが今まで報告されている。本研究の成果により、現在沿岸地域に広く見られるウイルス感染により放棄された養殖池の再生に寄与するだけでなく、ウイルス感染によるエビ養殖池の乱開発の防止、さらにはマングローブ林を含む沿岸生態系の保全にも大きく貢献することが期待される。第 4 章では、ウイルスの宿主への感染に非常に重要な働きをするエンベロープタンパク (VP28) に対するモノクローナル抗体を作成し、その特性評価に関する結果を報告した。単離されたモノクローナル抗体の中でも、最も強いウイルス感染中和作用を持つ抗体 (MAb216) は、ウイルスと混合しインキュベートする

ことでウイルス感染による致死率を 20% にまで低減させることができた。単離された抗体の中で高い中和能力を持つ本抗体についてさらに詳細な検討を進めるために、第 5 章では中和抗体中の抗原結合部位に関する分析結果を報告した。アミノ酸配列を解析した結果、抗原結合に重要な働きをしているといわれている抗体中の CDR3 領域の 12 アミノ酸残基がアスパラギン酸を豊富に含み、データベース中の他のアミノ酸は列とほとんど相同性を示さないことが明らかとなったことから、この 12 アミノ酸残基が抗原結合に関与していることが示唆された。遺伝子工学の最新の技術を用いることで今回明らかとなった抗原結合部位をもとに、今後、本研究の成果が抗原結合部位を利用した抗ウイルス剤の開発へと発展していくことが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、エビ養殖場で多大な損害をもたらしているウイルス病（ホワイトスポットシンドロームウイルス）の対策に有効な検出法の構築、さらにウイルスに対するモノクローナル抗体を活用したウイルス感染中和手法の開発を目的としたものである。ウイルス感染による養殖エビ大量死を防ぐにはまず、迅速かつ的確なウイルス検出が重要であるが、さまざまなウイルスによる感染症の可能性があるにもかかわらず、ウイルスを同時に検出する手法は今まで存在しなかった。そこで、本研究では、ホワイトスポットシンドロームウイルスとエビバキュロウイルスを同時に検出するための PCR 条件を最適化した。さらに、これまで検出が行われてこなかった土壌中のウイルスについても、DNA 抽出法とプライマーの再構築を行なうことによりかなりの低濃度のウイルス DNA までも検出することができる手法を開発した。

また、ホワイトスポットウイルスに対するモノクローナル抗体のウイルス感染中和活性を有するものを選抜し、その添加濃度と中和効果をエビ個体、エビ初代細胞を用いて明らかにした。中和活性が最も高かったモノクローナル抗体の抗原結合部位の変異部位のうち、中でも特に可変性と抗原特異性の高い CDR3 領域のアミノ酸配列を解読し、中和に関与している領域の一次配列を明らかにした。これにより、ウイルス感染を中和するペプチドの合成を容易にし、さらに、養殖池においてエビと共存している細菌に感染し繁殖するファージにアミノ酸残基を生産させその表面に提示させることによりウイルス感染を防止することが期待される。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。