

氏名	内藤 博敬
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位記授与番号	博乙第 4239 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 5 条第 2 項該当)
学位論文の題目	PCR 法を用いた微量ウイルス核酸の検出と環境モニタリングへの応用
論文審査委員	准教授 中尾 浩史 教授 岡本 敬の介 教授 三好 伸一

学位論文内容の要旨

本研究は、ウイルスを指標とした環境モニタリングを行うために、迅速かつ簡便な PCR 法を用いたウイルス核酸の検出および定量法の確立を行い、ウイルス検出および定量評価の有用性を検討することを目的としている。

第 1 章で、DNA ウイルスとしてサイトメガロウイルス (CMV) をターゲットとして、白血病や骨髄移植患者における抹消血中ウイルス DNA 量の臨床マーカーとしての有用性を検討した。移植前の免疫抑制剤投与時など、生体検査が困難な場合でも、抹消血中の CMV DNA の検出および定量によって、病状進展予測が可能であり、指標としての有用性が示された。

第 2 章では、RNA ウイルスとして HIV-1 をターゲットとして、HIV 感染患者抹消血中ウイルス RNA 量の臨床マーカーとしての有用性を検討した。DNA ウイルスと異なり、逆転写反応が加わる分、核酸の回収率、検出率は低下するものの、10 コピー以下の極微量であっても検出可能であり、また、定量によって投与薬剤の治療効果判定や治療開始・変更時期決定、病状進展予測などに、他の臨床マーカーとともに役立つことが示された。

第 3 章は、第 2 章の遊離ウイルス粒子に対して、感染細胞としてのプロウイルス DNA をターゲットとして、HIV 感染患者抹消血中プロウイルス DNA 量の臨床マーカーとしての有用性を検討した。治療効果が上がると、抹消血中のウイルス量は減少する。しかし、感染細胞自体は消滅していないため、組込まれたプロウイルス DNA は血球中から抽出されると推測され、HIV 治療の緩解指標としての有用性を探った。ウイルスゲノム RNA が見掛け上検出限界以下の場合でも、プロウイルス DNA 量は変動することから、RNA ウイルスにおいてはゲノム RNA とともにプロウイルス DNA を検出することも、指標として有用でことが示された。

第 4 章では、1～3 章までに得られた知見を応用し、食品衛生法に記載された食中毒ウイルスの感染経路の特定および環境指標としての有用性評価を目的として、ノロウイルス (NV) および A 型肝炎ウイルス (HAV) をターゲットとした、感染患者糞便、食品、環境中からのウイルス核酸検出と定量を試みた。推定伝播経路のうち、河川中からは検出されなかったが、患者糞便、下水、魚介類からウイルス RNA を検出した。また、冬期に流行する NV 感染症であるが、季節に関係なく環境中に存在していることを明らかとし、本法の有用性を示した。

第 5 章では、4 章の結果を受け、養殖産物として東南アジアから輸入される魚介類とともに国内に持ち込まれる輸入感染症としての NV を追跡した。ベトナムにおけるウシエビ養殖環境はもちろんのこと、周辺河川からも NV および HAV が検出された。また、養殖産物であるウシエビに感染するウイルスをターゲットとして検出および定量法の検討を行い、評価法を確立するとともに、原因不明感染症の特定にも役立てた。

第 6 章では、環境モニタリング施行後のウイルス感染予防対策についての見解を述べた。本研究で行った、ウイルス核酸を指標とした環境評価法の確立およびその有用性は、幅広い環境汚染に役立つことを示した重要な知見である。

論文審査結果の要旨

学位論文申請者は、高感度かつ定量性のある競合PCRを臨床患者および環境中にある種々のウイルスの検出や定量に応用した。まず、Human immunodeficiency virus type-1(HIV-1)患者血清中のウイルスRNA量の高感度定量的検出法(検出限界1コピー)を開発し、HIV-1のRNAを測定した。更に、本法が患者血清中のウイルスRNA量の治療に伴う変動も明確にできることを示し、本法による経時的定量は治療効果判定や病状進行予測へ応用できることを示した。続いて、環境水や感染原因食品からのノロウイルスの定量的検出法を開発し、ノロウイルスの推定伝播経路である患者糞便、魚介類、環境水のノロウイルスの検査に用いられることを示した。

日本における環境基準は殆どが化学物質を対象としており、微生物に関しては大腸菌群数のみが調べられており、ウイルスについては全く調べられていない。申請者は、本研究で検出限界が10コピーという高感度なウイルスの定量的検出法を開発することにより、ウイルスの環境モニタリングができることを提唱した。また、これらの検出法は、特殊な機器に頼ることなく、発展途上国でも実施可能であり、本法は世界規模でウイルス性感染症の研究に貢献すると考えられる。以上より、本学位論文は内容的には学位(博士)論文に十分な内容であることを確認した。