論文審査の結果の要旨

申請者氏名　　石　　川　　清　　康

近年、遺伝子工学皮術の進展に伴って幅広く用いられている技術の一つとしてPCR法が挙げられ、本法は、動物用生物学的製剤の品質管理を行う上でも迅速かつ高感度な技術として期待されており、その導入に関する検討は重要な研究課題の一つとなっている。

そこで、現在実施されている国家検定の検査項目を踏まえて、特に、マーカー試験、迷入ウイルス否定試験及び同定試験へのPCR法の応用について研究を行った。

第１章　gC遺伝子欠損オーエスキー病生ワクチンのマーカー試験への応用

PCR法によってgC遺伝子欠損オーエスキー病ワクチン株（dlg92／dltk株。以下「gC欠損ワクチン株」という。）の遺伝子欠損を確認することによるマーカー試験への応用の可能性について検討した。

gC欠損ワクチン株の遺伝子欠損領域を挟み込むようにプライマーを設定した1st-PCRでは、完全長gC遺伝子を持つYamagata-S81株を用いた場合、1,409bpのフラグメントが増幅され、一方、gC欠損ワクチン株を用いた場合、238bpであり、増幅フラグメントの塩基配列を決定したところgC遺伝子の一部が欠損していることが確認された。遺伝子欠損領域内にプライマーを設定した2nd-PCRでは、Yamagata-S81株を用いた場合、1,091bpのフラグメントが増幅され、一方、gC欠損ワクチン株を用いた場合、フラグメントの増幅はみられなかった。

gC欠損ワクチン株に10倍階段希釈したYamagata-S81株を混合させた試料を用いた場合、1st-PCR及び2nd-PCRにおけるYamagata-S81株の検出感度はそれぞれ10^5TCID$_{50}$/assay、10^2TCID$_{50}$/assayであった。この検出感度は、現在国家検定のマーカー試験法として実施されている間接蛍光抗体法の検出感度とほぼ同等であった。

以上の結果より、PCR法は、gC遺伝子欠損オーエスキー病生ワクチンのマーカー試験に応用可能であると考えられた。

第２章　豚流行性下痢ウイルス及び鶏細網内皮症ウイルスの迷入ウイルス否定試験への応用

豚流行性下痢ウイルス（PEDV）または鶏細網内皮症ウイルス（REV）のワクチン中への迷入の有無を確認するためのRT-PCR法について検討した。

野外材料11検体（小腸８検体及び糞便３検体）を用いた場合、小腸４検体の乳剤から抽出されたRNAにおいてのみ目的とする大きさのフラグメントか増幅された。この小腸４検体についてはVero細胞によるPEDV分離及びストレプトアビジン－ビオチン法（SAB法）による小腸粘膜上皮細胞内のPEDV抗原検出はいずれも陽性であった。なお、その他の７検体についてはVero細胞による連続３代継代培養を行ったがウイルスは分離されず、また、３代継代後の培養上清を用いたRT-PCR法でもPEDV遺伝子は

検出されなかった。

マレック病生ワクチンにREVのT株を添加した材料を用いた添加回収試験では、鶏胎児繊維芽細胞に1代継代した後の培養上清を用いたRT-PCR法の結果と国家検定で実施されている3代継代培養後の間接蛍光抗体法の結果は一致した。

以上の結果より、RT-PCR法は、PEDVの場合、Vero細胞によるウイルス分離法及びSAB法と同等であり、また、REVの場合、間接蛍光抗体法と同等であることから、本法はワクチン中へのPEDV及びREVの迷入ウイルス否定試験に応用可能であると考えられた。

第3章　豚コレラウイルスの同定試験への応用

豚コレラ生ワクチン株のGPE^{-}株とその親株であるALD株の全塩基配列をRT-PCR法によって増幅されたフラグメントを用いて決定し、動物や培養細胞を用いない新たな同定試験の開発の可能性を検討した。

両株ともゲノムRNAは12,298塩基から構成されており、373塩基の5'末端非翻訳領域、11,697塩基の単一の翻訳領域及び228塩基の3'末端非翻訳領域を有していた。5'及び3'末端非翻訳領域は既報告の塩基配列よりも長く、それぞれ13塩基、2塩基の挿入が認められた。ゲノムRNA全長にわたる両株間の相同性は、塩基レベルで98.2％であった。塩基及びアミノ酸置換はゲノムRNA全域にランダムに認められたが、5'及び3'末端非翻訳領域の塩基配列は高度に保存されていた。アミノ酸レベルで高度に保存されている領域はNS3及びNS4A領域であり、一方、N^{pro}及びE2領域はアミノ酸置換の頻度が高かった。

以上本論文は多くの豚や培養細胞等を用いてワクチン製造用株の性状を確認してきたこれまでの試験法に代わる迅速かつ高感度な新たな同定試験法の開発を行ったもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の論文として価値あるものと認めた。