

## 論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成10年度博士課程 入学

氏名 劉 長明

指導教官名 小野寺 節

論文題目: Cloning and Expression of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus

Nucleoprotein Gene and Construction of DNA Vaccine

(豚伝染性胃腸炎ウイルス核蛋白質遺伝子のクローニングと発現

およびDNA ワクチンの構築)

豚伝染性胃腸炎(TGE)は嘔吐、水様下痢を主徴とするウイルス性の急性伝染病である。本病はすべての豚に感染するが、発病率および死亡率は幼齢豚ほど高い。原因ウイルスであるTGEウイルス(TGEV)の生ワクチンしてより大規模な発生は激減したが、臨床症例の増加が報告されている。この理由としては野外での生ワクチンの効果が不十分であることが考えられる。TGEV粒子はスパイク糖蛋白質(S)、膜糖蛋白質(M)および核蛋白質(N)という3種類の構造蛋白質を持つ。S糖蛋白質は腸管における定着性に関与し中和抗体の結合部位が存在する。M糖蛋白質は $\alpha$ -interferon免疫応答を誘導する。N蛋白質はウイルスの複製や転写に関係し、細胞性免疫を誘導する。本研究では、N蛋白質の遺伝子をクローニングして、大腸菌の発現システムを用いて組換えN蛋白質を発現し、抗TGEV抗体の検出を目的とした間接ELISA法を開発するとともに、DNAワクチン開発を試みた。結果は以下の通りである。

### 1. TGEV N 蛋白質の遺伝子解析および発現

TGEV の T014 野外株を豚腎細胞 (CPK) で増殖させ、シヨ糖密度勾配遠心で精製し、ウイルスの RNA を得た。精製 RNA を鋳型として RT-PCR 法で N 蛋白質遺伝子の cDNA を増幅し、大腸菌用発現ベクター (pTrcHis) の *NheI* - *EcoRI* サイトに挿入した。N 蛋白質遺伝子の塩基配列 (1149 b) を公表されている他の TGEV 株の塩基配列と比較したところ、相同性は FS772/70, TF1, Purdue115 および Britain 96-1933 株とそれぞれ 98%, 97%, 98% および 96% であった。大腸菌発現系で N 隔合蛋白質を発現し、SDS-PAGE および Western-Blotting 法で 48.7 kDa の発現蛋白産物を検出した。

### 2. 抗 TGEV 抗体の検出を目的とした組換え N 蛋白質を用いた間接 ELISA 診断法の開発

TGEV の N 蛋白質は感染に際して最も大量に合成、発現され、かつ非常に安定な蛋白質なので、TGE の診断に適した標的分子であると考えられる。そこで、第一章で作成した組換え N-末端に histidine タグを持った N 蛋白質を作製し、アフィニティーカラムで精製するとともに間接 ELISA 法への利用を試みた。TGEV 中和試験陰性豚血清 101 サンプルと陽性豚血清 141 サンプルを用いて組換え蛋白質 (rnELISA) および精製ウイルス粒子 (pvELISA) を抗原とする ELISA 法を比較したところ、共に同程度の感度 (それぞれ 98.6% と 97.9%) と特異性 (それぞれ 98.0% と 99.0%) を示し、両者の測定値に高い相関性 ( $R=0.829$ ) が見られた。この結果は組換え N 蛋白質が TGE 診断用の ELISA 抗原として代用し得ることを示しており、組換え蛋白質の利点を考慮すると取り扱いが平易な TGE 診断法を提供するものと期待される。

### 3. TGEV の N 蛋白質遺伝子を用いた DNA ワクチンの構築

TGEV の N 蛋白質遺伝子の cDNA を哺乳類細胞用発現ベクター (pcDNA3.1) に挿入し、組換え DNA ワクチン (pcDNA/N) を構築した。哺乳動物類 COS 7 細胞にリポフェクシン法で遺伝子導入し、発現した N 蛋白質が抗原性を持つことを免疫蛍光抗体法によって確認した。このベクターの免疫原性を評価するために異なる投与量 (マウス 1 匹あたり 50, 100 および 200  $\mu$ g) の精製 DNA を 5 週間隔で二回 BALB/c マウスの筋肉内に接種し、上述の pvELISA を用いて特異

抗体の検出を試みた。その結果、pcDNA/N を接種した全てのマウスで抗体産生が認められ、少なくとも 11 週目まで持続した。最適の応答はマウス 1 匹あたり 100  $\mu$ g DNA を接種した群で観察された。この抗体は TGEV に対する中和活性は有していなかった。Western-Blotting 分析によって産生された抗体は N 蛋白質と思われる分子量 47 kDa のバンドと特異的に反応することが明らかとなった。抗体のサブクラスは IgG2a が優勢的で、これは pcDNA/N 接種マウスにおける Th1 型細胞の活性化を示唆するものと考えられた。またこのマウス由来の脾細胞は TGEV ワクチン株に対して強い応答を示すことが確認された。これらの結果は本ベクターが生体内で TGEV に対する液性ならびに細胞性の免疫応答の両者を効率的に誘導し得ることを示している。また DNA ワクチンの追加投与に対しては強い既往応答を示すので、記憶 T 細胞の誘導能をもつと考えられ、幼豚の早期免疫賦与にも利用できる可能性が示唆された。

本研究で得た研究成果は、TGEV 遺伝子の組み換え体を用いた本病に対する新しい診断法、予防用のワクチン技術の開発が可能であることを示唆している。組換え N 蛋白質を TGE 診断用の ELISA 抗原として代用することにより、取り扱いが平易で安全性の高い TGE 診断法の確立が可能となった。TGEV 感染と免疫については腸管内の IgA 抗体や細胞性免疫の重要性が明らかにされてきている。DNA ワクチンの免疫特徴は弱毒生ワクチンとおなじように抗原提示細胞内で新たに抗原蛋白が作られることになる。これら抗原は弱毒生ワクチンと同様に MHC クラス I を介しての細胞免疫を誘導しやすい利点をもつ。今回はマウスでの基礎試験を行なったが、細胞性の免疫応答を効率的に誘導し得ることを示唆された。今後はマウスでの基礎データをさらに積みかさねるとともに豚での臨床試験を試みなければならない。