

[別紙 2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 劉 長明

ブタ伝染性胃腸炎(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。原因ウイルスである TGE ウイルス(TGEV)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。本ウイルス(に対して生ワクチンが実用化され大規模な発生は激減したが、近年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(S)、膜(M)および核(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 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。

第一章では TGEV N 蛋白質の遺伝子解析および発現について記載した。TGEV の TO14 野外株を豚腎細胞 (CPK) で増殖させ、ウイルス粒子をショ糖密度勾配遠心法で精製し、ウイルス RNA を抽出した。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 蛋白質を発現し、SDS-PAGE および Western-Blotting 法で 48.7 kDa の発現産物を検出した。

第二章では組換え N 蛋白質を用いた抗 TGEV 抗体の検出を目的とする間接 ELISA 診断法の開発について記載した。TGEV の N 蛋白質は感染時に最も大量に発現され、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 N-末端に histidine タグを持った組換え N 蛋白質を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(mELISA)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、両者の測定値には高い相関性(R=0.829)が見られた。

第三章では TGEV の N 蛋白質遺伝子を用いた DNA ワクチンの構築について記載した。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。動物細胞 (COS-7) にリポフェクチ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 を用いて血清中の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した。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。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。

本研究で得た研究成果は、TGEV 遺伝子の組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, 取り扱いが平易な TGE 診断法が確立した。また, DNA ワクチンの免疫原性についてマウスで基礎試験を行なったところ, 液性および細胞性の両免疫応答を効率的に誘導し得ることが示唆された。 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。 当研究は TGEV に対する DNA ワクチンについて新たな知見を示した。 よって, 審査委員一同は, 本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。