The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Expression of Recombinant Norwalk-Like Virus Capsid Proteins Using a Bacterial System, and the Development of its Immunological Detection
Author(s)	依田, 知子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42769
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【30】

氏　　名	依　田　知　子（よだ　ともこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15610　号
学位授与年月日	平成12年5月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Expression of Recombinant Norwalk-Like Virus Capsid Proteins Using a Bacterial System, and the Development of its Immunological Detection （小型球形ウイルスキャプシッドの大腸菌による発現と免疫学的方法による検出システムの開発）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　上田　重晴　　教　授　堀井　俊宏 （副査） 教　授　山西　弘一　　教　授　生田　和良

論　文　内　容　の　要　旨

[目的]

小型球形ウイルス（Norwalk-Like Virus, 以下NLVと略す）のキャプシッドをコードしている遺伝子を使用し、大腸菌でリコンビナント蛋白を作製した。こうして得たリコンビナント蛋白を免疫してウサギで抗体を作製した。この免疫ウサギ抗体のNLVキャプシッドに対する反応性を調べて、NLV検出システムの開発の可能性を示唆すること。

[方法]

NLV株：Genogroup I（以下GIと略す）に属する1株（96-908）

Genogroup II（以下GIIと略す）に属する3株（36,21,114）の計4株を使用した。

NLVキャプシッドコード遺伝子：患者糞便からISOGEN-LS（日本ジーン）を使用してRNAを抽出し、RT-LA-PCRキット（宝酒造）でRT-PCRを行い目的のキャプシッドコード遺伝子を増幅させた。

蛋白の発現：上記の目的遺伝子（キャプシッドコード遺伝子）を発現ベクターであるpMAL-c2（New England BioLabs, USA）とpTrx-Fus（Invitrogen, USA）に組み込んだ。これらのベクターの宿主である大腸菌XL1-blueまたは、GI724を形質転換させて、それぞれMaltose-Binding Protein（MBP）または、Thioredoxin（TRX）の融合蛋白としてのキャプシッド蛋白を発現させた。

ウサギの抗NLV-36 IgG：上記で得たリコンビナント蛋白のMBP-NLV36を駆使してウサギを免疫し、抗血清を得て、これを精製しIgG分画を得た。

ウサギの抗NLV-36IgGの解析：4種類のNLVキャプシッド蛋白（リコンビナント蛋白）に対する反応性をELISA法およびウエスタンブロット法を使用して調べた。また、糞便中のNLV粒子を超遠心法にて濃縮し、ウエスタンブロット法を用いてこれらの粒子に対する反応性を調べた。

NLVキャプシッドリコンビナント抗原の解析：NLV感染患者血清によってこれらが抗原として認識されるかどうかをELISA法を使用して調べた。

[成績]

ウサギの抗NLV-36 IgGの解析：現在までに報告されている抗体と異なり、今回得られたウサギ抗NLV-36 IgGは、ELISA法およびウエスタンブロット法の両方で免疫に使用したタイプのリコンビナント抗原（キャプシッド）

だけでなくこれとは別のタイプのGⅡおよびGⅠのリコンビナント抗原にも反応した。また、免疫に使用したタイプと異なったGⅡタイプ（21と類似のタイプ）の患者糞便3検体のウイルス粒子に対する反応もウエスタンブロット法を使用して陽性となった。

NLVキャプシッドリコンビナント抗原の解析：NLV感染患者血清のうち代表的な2検体の急性期と回復期の血清を材料に3種類のリコンビナント抗原に対する反応性を調べたところ、急性期には、ほとんど認識されなかったリコンビナント抗原が、回復期には、認識されていることが判明した。

以上の成績により、今回得られたウサギ抗NLV-36 IgGを応用したNLVの免疫学的検出法開発の可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

小型球形ウイルス（Norwalk-like virus,NLVと略）は、食中毒の重要な原因の1つである。その検出方法は、現在、患者糞便よりRNAを抽出した後に、RT-PCR法で遺伝子を検出するという方法が用いられている。しかし、この方法は煩雑で時間がかかるため、食中毒発生時の迅速診断には適していなかった。本研究では、迅速に、かつ簡便に行える免疫学的検出法の開発を目的とした。

NLV Genogroup Ⅱのキャプシッド蛋白をコードする遺伝子を用い、大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白を作成し、精製後ウサギ免疫血清を作成した。得られた抗体はELISA法およびウエスタンブロット法で、NLVのGenogroup ⅠおよびⅡのリコンビナントキャプシッド蛋白と交差反応性を示し、患者便中から、精製したGenogroup ⅡのNLVにもウエスタンブロット法にて反応した。また、免疫に用いたリコンビナントキャプシッド蛋白は患者血清では回復期にのみ反応することも判明し、簡便で、かつ広域に抗原を認識できるNLV検出法の開発が可能になった。

本研究は、迅速かつ簡便な確定診断法の確立が望まれていたNLVによる食中毒の原因調査に重要な貢献をするものとして高く評価でき、学位の授与に値すると考える。