論文審査の要旨及び担当者

報告番号	甲 ㊙ 第　　号	氏　名	康　井　洋　介

論文審査担当者　　主　査　小児科学　高　橋　孝　雄
　　感染症学　岩　田　　敏　　ゲノム医学　小　崎　健次郎
　　微生物学・免疫学　本　田　賢　也
学力確認担当者：河上　　裕　　審査委員長：岩田　　敏
試問日：平成２８年　５月３１日

（論文審査の要旨）

論文題名：Cell fusion assay by expression of respiratory syncytial virus （RSV） fusion protein to analyze the mutation of palivizumab-resistant strains
（パリビスマブ耐性RSウイルス株のFusionタンパクの細胞融合能の解析）

本研究では、Respiratory syncytial virus（RSウイルス）のF、G、SHエンベロープタンパク質による細胞融合能の解析、RSウイルス感染の予防薬であるパリビズマブ存在下でのパリビズマブ耐性Fタンパク質による細胞融合能の解析を行った。細胞融合は、Fタンパク質単独発現でも認められ、F、SHタンパク質共発現により大型化した。Fタンパク質単独発現のうち、K272E変異およびS275F変異はパリビズマブ耐性だが、N276S変異はパリビズマブ耐性を示さないことが示された。

審査では、ワクシニアウイルスの感染状態を一定にできているか問われ、継代培養下のVero細胞を8 well chamber slide上に一定量播き一定時間培養後に細胞が単層であることを確認、その上で、同一条件下に凍結保存したワクシニアウイルス溶液を培養Vero細胞の数に応じて一定量使用することで対処したと回答された。これに対し、感染が成立したワクシニアウイルス量が一定であることを確認するために、感染後のVero細胞、培養上清に含まれるウイルス遺伝子またはタンパク質について定量解析すべきであった、と助言された。また、細胞融合について実験の再現性に関する質問がなされ、タンパク質単独発現ならびに共発現時の各エンベロープタンパク質の使用量、至適条件を決定するために、細胞濃度、細胞培養時間、ワクシニアウイルス量、遺伝子導入試薬の選択、培養時間の設定等を予備実験として複数回行っており、再現性は担保されていると考える、と回答された。タンパク質発現量が細胞融合能に影響する可能性があり、ウェスタンブロッティングなどにより定量解析することが必要であった、との助言がなされた。これに対し、ウイルスによる細胞融合には各エンベロープタンパク質の細胞表面における発現が必須であることからウェスタンブロッティングによる検証は避けた。代わりに、本研究と同様の条件で遺伝子導入し、未固定での免疫染色により細胞表面に各タンパク質を発現している細胞の出現率が一定であることを確認した、と回答された。

以上より、特に再現性の確保という点においてさらに検討すべき課題が残されているものの、パリビズマブ耐性RSウイルスの出現が懸念される現状で、RSウイルスによる細胞融合能における異なるエンベロープタンパク質の機能を評価し、パリビズマブ耐性アミノ酸変異を有するFタンパク質の機能解析を行った点において、実地の感染症診療に貢献しうる有意義な研究であると評価された。