

表 1 : UV 照射 SARS-CoV を免疫して得られた単クローン抗体の性情

mAb clones	Specificity	Neutralization	Western	Histochem.
SKOT-7	N	no	no	no
SKOT-8	N2	no	OK	OK
SKOT-9	N2	no	OK	OK
SKOT-3	S	100 μ g/ml	no	no
SKOT-10	S	10	no	no
SKOT-19	S	1	no	no
SKOT-20	S	1	no	no

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

SARSコロナウイルスに対するDNAワクチンの開発に関する研究

分担研究者 岡田 全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター

研究要旨

SARS ウイルス HKU39849 の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA 及び SARS TW1 株の cDNA を pcDNA3.1(+)-ベクター及び、His-Tag 発現ベクターに構築し、真核細胞及び大腸菌に導入した。N と M のリコンビナント蛋白を作製した。

4 種の S、M、N、E DNA ワクチンをマウス及びヒト免疫応答を解析しうる SCID-PBL/hu に免疫し、細胞性免疫（キラーT 細胞）を介してワクチン効果を発揮する SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。

さらにSCID-PBL/huを用い、SARSウイルス増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導するSARS(M)DNAワクチンを作製した。

A. 研究目的

本研究は世界的に多くの人命を奪い、さらには国民の経済基盤をも失う最悪の事態となる、SARS ウイルス感染症（中国・北米のみでなく全世界に対する国際貢献や我が国の国民の健康を守るためにも）に対して、我々が高い評価を受けている DNA ワクチン作成方法と中和抗体、キラーT 細胞分化誘導機構解析を用い、迅速に SARS ウイルスに対する新しいワクチンを開発するものである。まずは DNA ワクチンの開発を行う。ウイルス構造タンパクである Spike(S)、Envelope(E)、Membrane(M)、Nucleocapsid(N)の存在が明らかとなり、これらが宿主細胞への感染に重要な役割を演じていると推察できる。また SARS の治療に、回復者の血清を使い、抗体依存性の感染防御が可能であることを示唆する発表もある。この点を踏まえて SARS ウイルスに対する中和抗体を多量に産生誘導する新規 SARS ワクチンの開発を目指す。一方、ウイルス感染症における宿主側の抵抗性において、細胞性免疫、特にキラーT 細胞は極めて重要な役割を果たしている。したがって、SARS ウイルス感染肺胞上皮細胞に対して特異的なキラーT 細胞の分化誘導を（種々のベクターを用いて）S、E、M 又は N 構造蛋白 DNA を組み込んだ DNA ワクチンを作製することを目的とする。

すなわち、中和抗体依存性 SARS ワクチンとキラーT 依存性 SARS ワクチン開発の基礎的研究を行う。動物モデル、及びヒトの生体内免疫解析モデル(SCID-PBL/hu) を用いる。

B. 研究方法

1. SARS corona virus 又はその DNA は三種類入手した。SARS ウイルス HKU39849 は香港大学 Peiris 教授より供与された。SARS ウイルス TW1 cDNA は国立台湾大学 Pei-Jer Chen 教授より供与された。SARS corona virus(FFM-1 株)は東京医科歯科大学 山本直樹教授より入手した（図1）。

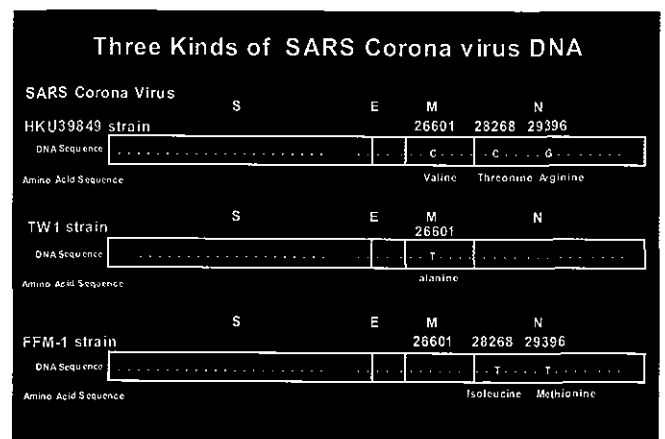


図1

2. 中和抗体依存性 SARS ワクチンの開発

(1) SARS ウイルス HKU39849 の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA の pcDNA3.1(+)-ベクターへの構築。国立感染症研究所 田代眞人部長、森川室長より供与された pGEM-E、M、N 及び pUC-19-S を酵素 cut (E: BglII, M: BamHI, N: BamHI, S: PvuI/BamHI) した。電気泳動を

行い、ゲルから切り抜き DNA を抽出した。一方、pcDNA3.1(+)-ベクターを BamH I で酵素 cut し、電気泳動した後、ゲルから切り抜き DNA を抽出した。これらを ligation して S、M、N、E cDNA を pcDNA3.1(+)-ベクターに導入した DNA ワクチンを構築した。発現蛋白を選別する目的で His tag 利用目的にて、真核細胞と大腸菌に S、M、N、E の各 cDNA の導入に際して、pcDNA3.1(+)/ V5-His Topo (真核細胞) とこれと同様の大腸菌発現用ベクターを使用した。いずれも、PCR 産物を CACC 配列を認識するトポイソメラーゼを利用して、PCR 産物 (E:250bp、M:659bp、N:1350bp、S:3768bp) を直接、topo クローニングサイトに導入して各 cDNA 入りのベクターを構築し、真核細胞、大腸菌での、S、M、N、E などの cDNA の発現実験などに使用した。

- (2) SARS TW1 DNA を、pcDNA3.1(+)-ベクターに構築した。これらをヒト免疫グロブリン染色体導入マウス (KM マウス:キリン石田功博士との共同研究) に免疫した。
- (3) 感染中和抗体測定法。BALB/c マウスと C57BL/6 マウスに 4 種の S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射し (m.tibia anterior)、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性で測定した。Vero-E6 細胞を平底 96 well plate にまき、SARS corona virus 100TCID₅₀(median tissue-culture infectious dose units)を感染させた。37°C 30 分 CO₂ incubator で培養した後、マウスあるいは SCID-PBL/hu マウスより採取した血清を 56°C 30 分非動化した後に 5 倍希釈から倍々希釈して加えた。2 日 (48 時間) 後に well を 20% formaldehyde で固定し、Amidoblack 10B で染色し、cytopathic effect (CPE) を測定した。この方法を用いて、血清中の SARS ウイルス中和抗体活性を測定した (共同研究 大阪府立公衆衛生研究所感染症部 奥野良信、加瀬哲男)。

3. 細胞性免疫 (キラーT 細胞) 活性の測定法:

- (1) マウス II 型肺胞上皮 cell line (T7) をキラーT 細胞の標的細胞として用いた。
- (2) T7 細胞に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い、IFN- γ 産生によるキラーT 活性を測定した。

(3) T 細胞の増殖反応を BrdU で測定した。

4. ヒト免疫応答解析モデル (SCID-PBL/hu) の作製。

- (1) IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト NOD-SCID マウス (実験動物中央研究所 野村達次所長との共同研究) に健常人 PBL を i.p 投与し、SCID-PBL/hu を作製した。これに DNA ワクチン 50 μ g を M.Anterior tibia に注射し、3~5 回免疫。最終免疫より、7 日後に採血。血清中のヒト中和抗体価を測定した。
- (2) SCID-PBL/hu の系を用いたタンパク抗原に対するヒト・キラーT 細胞の誘導 SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用いた。IFN- γ 産生によるキラーT 活性を測定。

(倫理面への配慮)

1. SARS ウイルスに対する DNA ワクチン研究においては施設内の組換え DNA 安全委員のみでなく、大臣確認申請許可をすでに得た。大臣確認申請をし、お墨付きとなった P3 レベル B3 レベル実験施設 (P3 レベル培養実験室 P3 レベル動物実験室) で厳密に研究を行っている。
2. 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。
3. 当院は厚生労働省より呼吸器疾患の準ナショナルセンター (高度専門医療施設) に選ばれたことにより、倫理・安全対策等への配慮を十分おこない臨床応用を目指している。

C. 研究結果

1. 中和抗体依存性 SARS ワクチンの開発

- (1) SARS ウイルス HKU39849 の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA (共同研究者 田代眞人部長、Peiris 教授) を pcDNA3.1(+)-ベクターに構築した (図 2)。

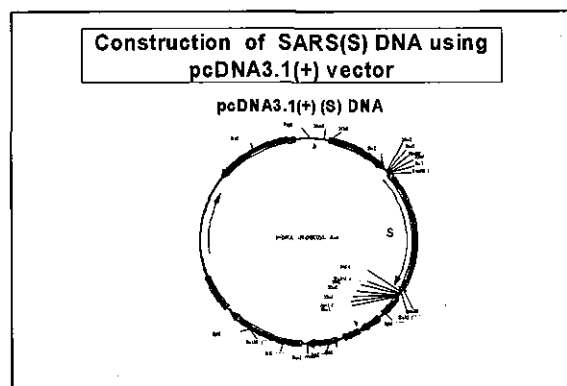


図2 pcDNA3.1(+)-ベクターを用いた SARS(S) DNA の構築

PcDNA3.1(+)-ベクターのマルチクローニングサイトに各々の cDNA を挿入した(図 2)。

His-Tag 発現ベクターにもこれらの DNA をすべて導入することに成功し、又大腸菌にもすでに S、M、N、E cDNA を導入した。

すでに N と M のリコンビナント蛋白を精製した。S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA が pcDNA3.1(+)-ベクター及び pcDNA3.1(+)-His Tag ベクターに正しく挿入されたか否かを DNA Enzyme Cut で解析した。その結果、各々正しい長さの cDNA が間違いなく挿入されたことが示された。

さらに、Cos7 細胞と T7II 型肺胞上皮細胞に S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA 挿入 pcDNA3.1(+)-His Tag 遺伝子を導入し、His-Tag 抗体で染色した(図 3)。その結果、SARS(S)、SARS(M)、SARS(N)、SARS(E) DNA のすべての DNA が Cos 細胞及び T7 細胞に導入され蛋白発現が認められた。

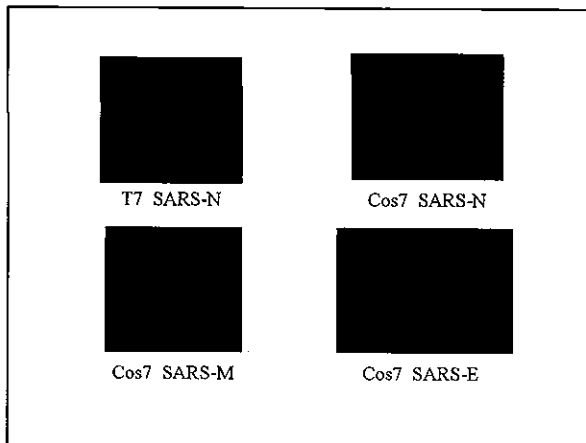


図 3 Cos7 細胞と T7II 型肺胞上皮細胞における導入遺伝子による SARS S、M、N、E 蛋白の発現

さらに、大腸菌に SARS(N) DNA を導入すると SARS N 蛋白が産生され、His-Tag カラムで精製すると一本のバンドとなった。すなわち非常に purify されたリコンビナント N 蛋白を作製した(図 4)。

なお、pcDNA3.1(+)-ベクターに挿入された S、M、N、E DNA が塩基配列の変異なく挿入されたかを、キャピラリーシークエンサーで確認のためシークエンスした。その結果、元の挿入前の塩基配列と同じ塩基配列であることが示された。

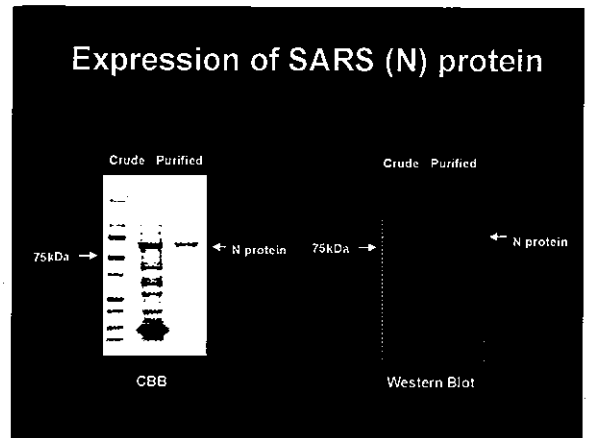


図 4 リコンビナント N 蛋白の作製

- (2). 国立台湾大学 Pei-Jer Chen 教授より SARS TW-1 DNA を入手し、pcDNA3.1(+)-ベクターに構築した。
- (3) BALB/c マウスと C57BL/6 マウスに 4 種の S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射し、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性を測定中である。

2. 細胞性免疫 (キラー T 細胞) による新しい SARS DNA ワクチンの開発:

マウス II 型肺胞上皮 cell line(T7)を用いて、T7 細胞に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い SARS(S) DNA キラー T 活性を測定した。その結果、ウイルスに対する T 細胞免疫 (増殖反応と IFN- γ 産生) を増強する pcDNA3.1 SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した(図 5)。

SARS(N) DNA ワクチン (キラー T 依存性) 図 5 (A)

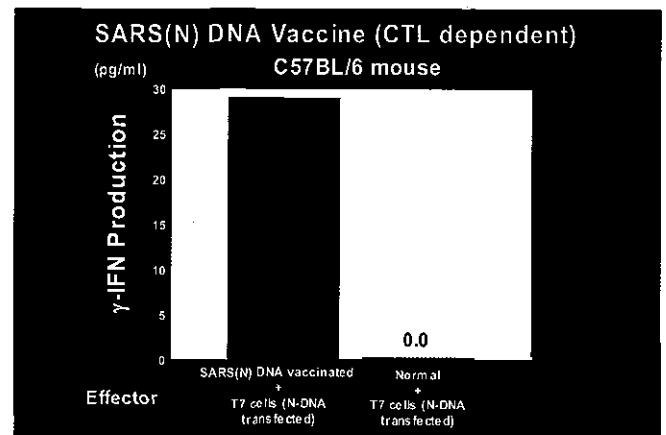


図5(B)

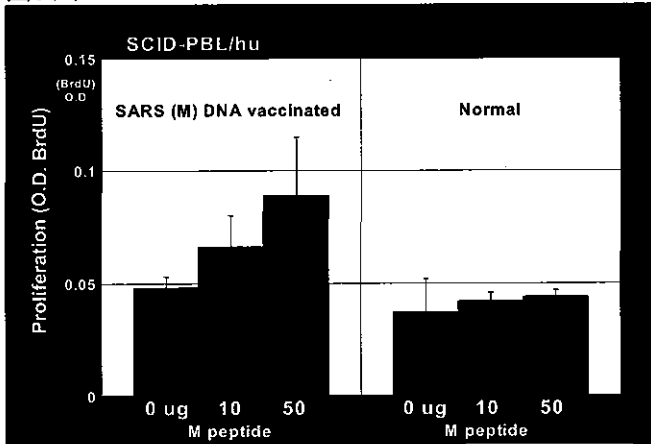


図5 キラーT依存性SARS(M) DNAワクチンの作製

3. ヒト免疫応答解析モデル (SCID-PBL/hu) を用いた SARS ワクチンの開発

(1) 健常人 PBL (末梢血リンパ球) を SCID マウスに i.p 投与して作製した SCID-PBL/hu に DNA ワクチンを免疫し、血清中の SARS S、M、N、E に対するヒト中和抗体価を測定した。

(2) その結果、

- ① 中和活性を示すヒト抗体を産生する SARS(M) DNA ワクチンが開発された。
- ② 中和活性よりも増殖阻止活性が強い可能性あり。

SARS (M) DNA ワクチン (SCID-PBL/hu) の血清 (ヒト抗体) は SARS ウイルス感染 Vero 細胞に対し、ヒト中和活性及び SARS ウイルス増殖阻止活性を示した。すなわち抗体依存性 SARS(M) DNA ワクチンを確立した。

(3) SCID-PBL/hu の系を用いてタンパク抗原に対するヒト・キラーT 細胞の誘導系を確立した。SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンが SARS に対するヒト T 細胞免疫 (増殖反応と γ -IFN 産生) を増強した。SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用い、SARS(N) DNA ワクチンは、ヒト・キラーT 依存性ワクチンであることを明らかにした。

D. 考察

1. 本研究において 4 種の SARS ウイルス S、M、N、E DNA ワクチンをマウス及びヒト免疫応答を解析しうる SCID-PBL/hu に免疫し、細胞性免疫 (キラ

ーT 細胞) を介してワクチン効果を発揮する SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。

さらに SCID-PBL/hu を用い、SARS ウイルス増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導する SARS(M) DNA ワクチンを作製した。

- (1) SARS(M) DNA ワクチンは M 蛋白に対する抗体の産生を誘導し、この抗体はすでに SARS に感染した細胞にも作用し、SARS ウイルスの増殖を抑制する効果が示された。すなわち、SARS ウイルスが感染しても広がらない作用を発揮する可能性が示唆された。
- (2) 我々が世界に先駆けて確立した SCID-PBL/hu の系(Cancer Res, 1997) を SARS DNA ワクチンの開発に応用し、キラーT 依存性 SARS ワクチンのみならず抗体依存性 SARS ワクチンを作製した。このことより SCID-PBL/hu の系は、SARS ワクチンにより活性化されるヒトキラーT、ヒト B 細胞生体内ヒト免疫応答を解明する上で、強力な武器を提供することが示された。又、我々が世界に先駆けて確立した II 型肺上皮細胞 cell line T7 は、SARS ウイルスの target が肺胞 II 型上皮であることが報告されていることより、SARS ワクチン効果の詳細な解明に極めて重要な役割を果たすことが考えられる。

E. 結論

SARS ウイルス HKU39849 の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA 及び SARS TW 1 株の cDNA を pcDNA3.1(+)ベクター及び、His-Tag 発現ベクターに構築し、真核細胞及び大腸菌に導入した。N と M のリコンビナント蛋白を作製した。

4 種の S、M、N、E DNA ワクチンをマウス及びヒト免疫応答を解析しうる SCID-PBL/hu に免疫し、細胞性免疫 (キラーT 細胞) を介してワクチン効果を発揮する SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。

さらに SCID-PBL/hu を用い、SARS ウイルス増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導する SARS(M) DNA ワクチンを作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. Vaccine 2005 (in press).
- (2) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, deMello DE, Peiris JSM, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. Immunology 2004. MEDIMOND International Proceedings 449-452.
- (3) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M1), Yoshida S3), Matsumoto M4), Kase T, Peiris M, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: Development of vaccines against the severe acute respiratory syndrome(SARS) corona virus. GLOBAL VACCINOLOGY INTERNATIONAL FORUM (7th) Disease Immunisation and Immunotherapy, 5-7 March 2005 Dubai, Emirates.

2. 学会発表

- (1) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Daphne E. deMello, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: The Development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. 12th International Congress of Immunology, 2004.
- (2) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Daphne E. deMello, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu mice. 4th World Congress of vaccine and Immunisation. 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の SARS 生ワクチンとしての応用

分担研究者 石井孝司（国立感染症研究所）

研究要旨 DI_s 株は、ほとんどの哺乳類細胞に感染するが増殖しない高度弱毒化ワクチニアウイルスである。本研究ではこの株に SARS-コロナウイルス (SARS-CoV) の構造蛋白遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作成し、SARS ワクチンとしての可能性を検討した。組換え DI_s は、マウスに投与した場合ターゲットとなるウイルス蛋白に対する液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、前もって E/M/S または E/M/M/S を発現する組換え DI_s を接種したマウスは、SARS-CoV のチャレンジに抵抗性を示し、これらの組換え DI_s に強いワクチン効果があることを示すことができた。従ってこれらの組換え DI_s は SARS に対する安全な組換え生ワクチンの有望な候補であると考えられる。

A. 研究目的

約 40 年前に国立予研において大連株より樹立された DI_s は、ニワトリ胎児繊維芽細胞 (CEF) でのみ増殖し、ほとんどの哺乳類細胞では感染するが増殖しない高度弱毒株である。本研究で我々は、本ウイルスに SARS-CoV の構造蛋白 (E、M、N、S) を組み込んだ組換えウイルスを作製し、1. 目的蛋白の哺乳類細胞での大量発現、2. 組換えウイルス感染細胞での virus-like particles 生成の検討、3. 組換えウイルスの免疫誘導能の検討を行う。今回は、組換えウイルスを小動物に投与して免疫誘導能の確認を行い、組換え生ワクチンとしての可能性を検討した。

B. 材料と方法

香港で分離された SARS-CoV 株 HKU39849 からクローニングされた各構造蛋白遺伝子を、DI_s へ外来遺伝子を挿入するためのトランスファーベクターに組み込み、DI_s を感染させたニワトリ胎児繊維芽細胞 (CEF) 中で相同組換えを起こさせることにより組換えウイルスを取得した。発現の確認のため、感染動物モデルとして使用されたサル血清とモンゴル人患者血清を使用して FA 及びウエスタンブロットを行った。これらの組換え DI_s をマウスに皮下あるいは経鼻投与し、SARS-CoV 構造蛋白

に対する免疫誘導能の検討と、マウス血清のウイルス中和能を調べた。また、前もってこれらの組換え DI_s で免疫したマウスへの SARS-CoV 感染実験を行った。

C. 研究結果

合計 9 種の組換え DI_s を作製し、哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が効率よく発現されることを確認した。これらの組換え DI_s をマウスに皮下投与したところ、目的の SARS-CoV 構造蛋白に対する液性、細胞性免疫がともに誘導されることを確認した。また、スパイク蛋白 S を発現する組換え DI_s を投与されたマウスの血清中には、SARS-CoV の Vero E6 細胞への感染を阻害する活性が存在した。一方、組換え DI_s を鼻腔から投与した場合、鼻腔洗浄液中に目的蛋白に対する IgA 抗体が誘導された。また、SARS-CoV 構造蛋白のうち、E/M/S または E/M/M/S を発現する DI_s を接種されたマウスでは、SARS-CoV を経鼻感染させた 3 日後の肺洗浄液中から SARS-CoV は検出されず、同組換え DI_s の接種により強いワクチン効果があることが実証された。

D. 考察

DI_s は約 40 年前に副作用のない種痘の候補とし

てヒトへの投与実験も行われており、安全性の高さはすでに確認されている。また我々は、感染症研究所エイズ研究センターとの共同研究で、HIVの蛋白を発現する組換え DIIs に HIV 感染防御効果があることを見出し、組換え DIIs の安全性の確認実験をすでに終了し臨床実験の準備を進めている。これらの結果から、SARS-CoV の構造蛋白の全部または一部を発現する組換え DIIs は、SARS に対する安全な組換え生ワクチンとなり得ると考えられる。

E. 結論

SARS-CoV の構造蛋白を発現する組換え DIIs は、マウスに投与した場合ターゲットとなるウイルス蛋白に対する液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導し、S 蛋白を発現する DIIs を投与されたマウスの抗血清にはウイルス中和活性も存在した。また、前もって E/M/S または E/M/M/S を発現する組換え DIIs を接種したマウスは、SARS-CoV のチャレンジに抵抗性を示し、これらの組換え DIIs に強いワクチン効果があることを示すことができた。従ってこれらの組換え DIIs は SARS に対する安全な組換え生ワクチンの有望な候補であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. *Int. Immunol.* 16:1423-1430, 2004.

2. 学会発表

1) Okamoto T., Someya-Kimura T., Moriishi K., Watanabe R., Ishii K., Nunberg J.H., Suzuki T.,

Miyamura T., and Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heiderberg Germany, October 3-7, 2004.

2) Murakami K., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Tanaka K., Shoji I., Sata T., Suzuki T., Bartenschlager R., and Miyamura T. Assembly of HCV-like particles in three-dimensional cultures. 11th International Meeting on HCV and Related Viruses, Heiderberg Germany, October 3-7, 2004.

3) 飯島沙幸、石井孝司、李 永仲、岩田奈織子、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、鈴木哲朗、佐多徹太郎、宮村達男、明里宏文：C型肝炎のサル病態モデル開発、第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。

4) 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、田中恵子、勝二郁夫、佐多徹太郎、鈴木哲朗、宮村達男：三次元肝細胞培養システムによるC型肝炎ウイルス(HCV)粒子形成、第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。

5) 町田早苗、松井政則、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、赤塚俊隆：HCV envelope E1 (signal peptide)-E2 をコードする DNA を用いた HCV E2 特異的 CTL の誘導 第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。

6) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIIs の SARS 生ワクチンとしての応用 第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。

7) 松山州徳、石井孝司、森川 茂、田代真人、田口文広：SARS-CoV S 蛋白のプロテアーゼによる開裂と膜融合活性 第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。

8) 石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、吉崎佐矢香、

森川 茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、横田
恭子、高須賀直美、大西和夫、鈴木哲朗、宮村達
男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIIs の組換
え生ワクチンとしての応用 第8回日本ワクチン
学会、平成16年10月、札幌。

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 2004-242937・石井孝司他 12 名・財団法人ヒ
ューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイル
スタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質を
コードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タン
パク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス
DIIs 株。・2004年8月23日出願
- 2) 2004-225043・石井孝司他 4 名・独立行政法人
医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク
質をコードする DNA を保有する組換えワクチニア
ウイルス DIIs 株、およびその利用・2004年8月2
日出願

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

中和エピトープの解析

分担研究者 黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門

研究要旨

分担研究者らのグループでは、数 10 名のドナーから採取した B リンパ球を用いて約 1000 億個のクローンからなるヒト抗体ライブラリー(AIMS)を作製して様々な疾患に対する治療用抗体の単離調製を実施している。SARS ウイルスを構成する膜タンパク質である Spike(S)タンパク質に対する抗体がウイルス中和能を有することが既に示されており、AIMS ライブラリーの中にも、SARS ウイルス中和抗体が含まれていることを期待できる。分担者のグループでは、細胞膜上に発現した事実上全ての分子に対して、網羅的に抗体を単離する技術開発に成功した。本研究は、その技術を用いて SARS ウイルスの S タンパクに特異的に結合する抗体を多数単離し、その中からウイルス中和活性を示す抗体を選別する。その抗体の認識するエピトープを同定すると同時に治療用抗体を単離するのが目標である。本年度は、外来遺伝子（この場合 S タンパクをコードする）を特定の宿主細胞に強制発現させて、発現された分子に対する抗体を効率的に単離するシステム開発を実施した。

A. 研究目的

SARS 発症後治癒したヒト体内には、強力なウイルス中和活性を示す抗体が同定されている。これは SARS 疾患に対してワクチン予防が可能であり、また中和抗体による治療が可能であることを示している。日本人の中に未だ SARS 発症者はいないので、SARS 感染の結果 SARS ウイルスに対して生体内で成熟した（抗原親和力を増大させた）中和抗体が、分担者らが作製した抗体ライブラリー(AIMS)の中に含まれていることは期待できない。しかし、用いる抗体ライブラリーは数 10 名のヒトに由来する

1000 億個の独立したクローンからなる巨大なレパートリーを含み、既に単離した様々な抗原に対する抗体の解析結果は、SARS ウイルスに対して中和抗体が AIMS ライブラリーの中に多数含まれていてもおかしくないと予想された。換言すれば、抗体のナイーブレパートリーの中にも充分大きなサイズの抗体ライブラリーを作製すれば、様々なナイブ抗原に対して強い結合力を示す抗体が頻度は低いですが必ず含まれている。分担者らは最近細胞膜上に発現した分子に対する抗体を網羅的に単離する技術開発に成功した。この技術の場合、細胞自

身を抗原として用いる。多数の細胞と抗体を発現した多数のファージ粒子集団（抗体ライブラリー）を混合して、抗原抗体複合体を形成させる。その後、遠心操作によって有機溶媒層へ複合体を移動させて複合体を形成しなかったファージ粒子を除く。この技術では抗原抗体複合体を形成することが抗体単離の条件となるために、相対的に結合力の強い抗体が選択的に単離される。本年度は、どのようなベクターを用いて目的とする遺伝子を組み込み、どの細胞に導入すれば目的分子に対する抗体を効率的に得られるか、条件設定を行った。

B. 研究方法

本プロジェクトで分担者らの採用する戦略は以下の通りである。

1. 目的とする遺伝子（X）を細胞膜上に発現した細胞（+X）を得る。
2. 抗体ライブラリーより、細胞（+X）に結合する抗体を多数単離する。
3. 細胞（+X）に結合し、細胞（-X）に結合しない抗体を選別する。
4. 細胞（+X）の膜タンパクをビオチン標識した後、膜タンパク質を可溶化する。抗体を用いた IP により抗原を単離し、ストレプトアビジンをプローブとしたウェスタンブロットで抗原を同定する。
5. 抗原 X に対する抗体の SARS ウイルス中和活性を測定する。
6. 抗体を IgG 型ヒト抗体に変換して大量調製する。

（倫理への配慮）

用いる抗体ライブラリーの作製等、幾つか

ヒト臨床材料を使用した。それは全て過去に於いて倫理委員会の承認の下に行われた研究である。

C. 研究結果

発現ベクターとして次のものを試した。

pDisplay: CMV プロモーターを持つ。N 末端にシグナル配列と HA エピトープを有する。C 末端に Myc-tag を有し、更にトランスメンブレン領域を有する。

このベクターを用いると、細胞領域のみを組み込めば膜タンパク質として発現される。

pcDNA3.1/myc-His: CMV プロモーターを持つ。Myc-tag と His-tag を持つ。

このベクターを用いると、分泌タンパクとして発現される。

両ベクターとも DNA 複製起点として SV40 を用いるので、宿主細胞としては Large T 抗原を持つものが望まれ、293T 細胞、CHO 細胞、COS 細胞を試した。その結果、一過性の発現ではあるが、70%程度の形質導入効率がコンスタントに得られる条件設定に成功した。そこで試した数種類の抗原について全てヒト抗体が得られることが判明した。

D. 考察

SARS ウイルス S タンパク質に特異的に結合する抗体を単離する技術的問題は解決した。当初、分担研究者が本班研究に参加する際に、SARS 発症者で治癒した経験を有するヒトの協力を期待した。分担者らの研究室では、特定のウイルスや毒素に対する中和抗体を有しているヒトが成分採血（3L 相当のリンパ球）にボランティアとして協力してくれれば、巨大抗体ライブラ

リーを作製して、その抗体を確実にモノクローン抗体として得る技術開発に成功している。この方法は、ハブ毒中和抗体単離に威力を発揮した。しかし、それが可能な状況ではなく、一方、様々なナীব抗原に対しても強い結合力を示す抗体が確実に得られる例を何度も経験して、AIMS ライブラリーからでも確実に中和抗体を得られるであろうと確信するに至った。更に今後、単離した抗体の中和測定を森川茂博士（感染研）のグループにお願いする共同研究体制の構築も完了したので、平成 17 年度には確実にプロジェクトを次の段階へと進行させられる。

E. 結論

SARS ウイルスに対する治療薬としてのヒト抗体単離に必要な技術上の問題点を解決し、更に共同研究体制の構築を終了した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. K.Higo-Moriguchi, Y.Akahori, Y.Iba, Y.Kurosawa, & K.Taniguchi: Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses. *J. Virol.* 78, 3325-3332 (2004).
2. A. Ideno, M.Furutani, T.Iwabuchi, T.Iida, Y. Iba, Y. Kurosawa, H. Sakuraba, T. Ohshima, Y. Kawarabayashi, & T.Maruyama: Expression of foreign proteins in *Escherichia coli* by fusing with

an archaeal F506 binding protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 99-105 (2004).

3. S.Hidaka, Y.Akahori, & Y. Kurosawa: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 17, 10553-10567 (2004).

II. 学会発表

1. 黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体」 人工血液を作る(5)、於：慶応大学北里講堂、平成 17 年 2 月 11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定

特願 2003-406554、

平成 15 年 12 月 4 日出願

抗 SARS-CoV 剤の開発に関する研究

分担研究者 山本典生（東京医科歯科大学）

研究要旨 すでにヒトで用いられている抗ウイルス薬約 30 種類に関して抗 SARS-CoV 活性を調べたところ、HIV プロテアーゼインヒビターのひとつであるネルフィナビルが抗 SARS-CoV 活性を持つことを見出した。また、in silico screening によって高い抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤の同定に成功した

A. 研究目的

本研究の目的は抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤を同定することである。抗ウイルス剤開発は、医学的側面からばかりでなく経済的な見地からも、社会に与える影響は極めて大きいと思われる。

B. 材料と方法

経験および理論に基づいて抗 SARS-CoV 剤の候補となる物質を集め、それらの抗ウイルス活性を in vitro の系を用いて評価した。SARS-CoV の株としては FFM-1 株を用い、評価方法としては MTT assay, リアルタイム RT-PCR 等を用いた。

C. 研究結果

1)すでにヒトで広く使われている抗ウイルス薬から抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤のスクリーニングを MTT assay によって行ったところ、HIV protease 阻害剤のひとつである nelfinavir が抗 SARS-CoV 活性を持っていることが明らかとなった。リアルタイム PCR によってウイルス RNA の定量を行ったところ、nelfinavir 処理をした Vero E6 cell では RNA 量がコントロールと比較

して約 1%まで減少していた。また IFA を行ったところ、コントロールでは多数の蛍光陽性細胞が検出されたのに対し、nelfinavir 処理をした Vero E6 cell では陽性シグナルがほとんど検出できなかった。

2)また、我々は in silico screening により約 100 万種類の化合物の中から SARS-CoV の 3CL プロテアーゼ阻害剤の候補物質を約 100 種類に絞り込み、実際の抗ウイルス活性を測定したところ、強い抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物の同定に成功した(RIKEN00046)。リアルタイム PCR によってウイルス RNA の定量を行ったところ、同定された化合物により処理された Vero E6 cell ではウイルス量がコントロールと比較して 1%未満まで減少した。この物質は recombinant proteinase を用いた実験においても阻害活性を示した。

D. 考察

1) nelfinavir の作用機序に関して手がかりを得るために、time-of-addition assay を行ったところ、nelfinavir は感染後 3 時間で加えても抗ウイルス活性はほとんど変化しないことが明らかとなった。コントロール Vero E6 cell と nelfinavir 処理

した Vero E6 cell とで細胞内にエントリーしたウイルス RNA を定量したところ、両者でほとんど差はなかった。これらの結果は nelfinavir のターゲットがウイルスマイクロサイクルのエントリーより後のステップだということを示唆している。

2) in silico screening から同定されたこの化合物 (RIKEN00046) は、recombinant SARS-CoV main proteinase による in vitro cleavage assay においても阻害活性を示した。この結果から少なくともこの化合物が SARS-CoV main proteinase の活性を直接抑制できることが示唆された。

E. 結論

本研究により抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物が同定された。nelfinavir および RIKEN00046 は新規抗 SARS-CoV 薬開発のリード化合物としても有望であると我々は考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) **Yamamoto N**, Yang R, Yoshinaka Y, Amari S, Nakano T, Cinatl J, Rabenau H, Doerr HW, Hunsmann G, Otaka A, Tamamura H, Fujii N, Yamamoto N.

HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus.

Biochemical and Biophysical Research

Communications. 2004 Jun 4;318(3):719-25.

2. 学会発表

1) **Yamamoto N**.

Therapeutic aspects of SARS

International Workshop on SARS. , 2004

2) **山本典生**、**山本直樹**

HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルによる SARS コロナウイルス複製の抑制

第 14 回抗ウイルス化学療法研究会抄録、69 ペ

ージ、2004

4) **山本典生**、**山本直樹**

SARS-CoV の増殖を抑制する薬剤の同定

第 52 回日本ウイルス学会学術集会抄録、135 ペ

ージ、2004

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 抗 SARS ウイルス剤 特願 2004-255819

2) プロテアーゼインヒビター 特願 2005-64664

フェレットおよびネコ ACE2 の同定と SARS-CoV レセプターとしての機能

分担研究者 山田靖子（国立感染症研究所）

協力研究者 座本 綾（国立感染症研究所）

研究要旨 SARS の原因ウイルスである SARS コロナウイルス (SARS-CoV) は、ヒト以外にも、ハクビシンをはじめとする野生動物が広く感受性であることが明らかとなっている。また、実験的に SARS-CoV を接種したフェレットやネコではウイルスが増殖することが明らかにされ、とくにフェレットは致死的事であることからワクチン開発等の研究に頻りに用いられている。一方、アンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) は SARS-CoV のレセプターであることが判明したが、現在までにヒトおよびマウスでのみ同定されている。そこで、本研究ではフェレットおよびネコの ACE2 同定を試み、ヒトおよびマウスと比較するとともに、フェレットの ACE2 については培養細胞に発現させ、ウイルスレセプターとしての機能を調べることを目的とした。

A. 研究目的

SARS 関連コロナウイルス (SARS-CoV) は SARS (重症急性呼吸器症候群) 患者から分離された病因ウイルスである。野外では広東省のハクビシン、イタチアナグマ、タヌキから SARS-CoV ゲノムまたはこれに対する抗体が検出されている。一方実験的には、Osterhaus らが、フェレットやネコに SARS-CoV を経気道接種した場合、2 日目から 8 日目に咽頭からウイルスが分離され、特にフェレットでは致死的事であることを報告した。SARS-CoV に対する感受性が高いフェレットは、ワクチン開発、病態解析、治療法の研究に感染モデルとしての使用が増加している。一方、アンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) はレニンアンギオテンシン系カスケードに含まれる ACE のホモログであり、心機能や高血圧との関連が認められているが、最近 SARS-CoV のレセプターが ACE2 であることが明らかとなり、SARS-CoV が細胞へ侵入する過程で重要な役割を果たすことが確認された。しかし、ヒトやマウス以外での ACE2 の研究はなされていない。そこで本研究ではフェレットおよびネコの ACE2

を同定し、SARS-CoV レセプターとしての機能を解明することを目的とした。

B. 材料と方法

1. mRNA 抽出および臓器の選択

フェレットおよびネコの各臓器（脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、大腸）より抽出した RNA を cDNA に逆転写し PCR のテンプレートとして用いた。一方、既に報告されているヒト、マウス、ラットの ACE2 塩基配列を参考に ACE2 の ORF 内部および末端側に共通プライマーを設計し、PCR およびシーケンシングに用いた。フェレットおよびネコの β -actin 塩基配列の共通部分にもプライマーを設計し、コントロールとして用いた。フェレットおよびネコの各臓器から得た cDNA に対し、ACE2 の部分配列約 500bp と β -actin が増幅されるよう PCR を行ったところ、両動物種とも腎臓を用いた場合が最も効率よく増幅された（図 2）。よって、本実験では腎臓から得た cDNA を出発材料とした。

2. 塩基配列の決定と解析

開始コドン上流あるいは終始コドン下流を含めて塩基配列を決定するために、2049bp のオーバーラップを含む2領域にわけて PCR を行い、増幅を試みた (図1)。予想サイズの増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンスに用いた。塩基配列解析は GENETYX-MAC 内にあるプログラムを、また、配列内のドメイン解析は PROSITE (<http://kr.expasy.org/prosite/>) を利用した。

3. プラスミドへの組み込みと培養細胞への導入

フェレット ACE2 の ORF 全長(2415bp)を PCR で増幅し、これを pTarget (Promega) に組み込んだ。精製したプラスミドを ACE2 非発現細胞である HeLa229 細胞に TransFast Transfection Reagent (Promega) を用いて導入し、Geneticin にて恒常的発現細胞を選択培養した。

4. SARS-CoV の接種

得られた恒常的発現細胞 1.2×10^4 に SARS-CoV を MOI 0.01 で接種した。1および2日後の培養上清中のウイルス価を VeroE6 を用いたプラークアッセイにて測定した。

C. 研究結果

1. 各臓器からの ACE2 部分配列の増幅

フェレットおよびネコの各臓器からは予想されるサイズの ACE2 部分配列 (952bp) が増幅された (図2)。しかし、産物量に違いが認められ、最も増幅産物量が多かったのはともに腎臓を用いた場合であった。

2. フェレットおよびネコの ACE2 単離と塩基配列の解析

ACE2 の共通配列部分に設計した内部プライマーを用いてダイレクトシーケンスを行い、フェレット 2637bp、ネコ 2634bp の塩基配列を決定した。これらの配列から予想される、ACE2 のアミノ酸配列はいずれも 805 アミノ酸残基で、既に報告のあるヒトおよびマウスとの identity および similarity は 81.5%~89.7%と 96.5%~98.5%であった (表1)。ACE2 の全アミノ酸配

列を図3に示した。配列中には共通して、17 残基のシグナル配列 (1-17)、C 末端上流の膜貫通領域 (741-763)、酵素活性部位である亜鉛結合ドメイン (271-380) が確認された。また、予想される N 型糖鎖の結合部位はフェレットで 6カ所 (53, 299, 322, 546, 660, 690)、ネコで8カ所 (53, 90, 216, 299, 322, 546, 660, 690)あり、ヒトで報告されている結合部位 (53, 90, 103, 322, 432, 546, 690)とは一部異なっていた。その他には、ACE2 細胞内領域に tyrosine および casein kinase2 リン酸化部位 (775-781 と 787-790) の存在が予想された。

3. SARS-CoV の感染

フェレットの ACE2 を導入した HeLa 細胞に SARS-CoV を感染させた場合のウイルスタイト (上清 50 μ l 中) は1日目が 7.4×10^3 pfu、2日目が 1.4×10^6 であり、ACE2 を導入していない HeLa 細胞 (1日目 3.9×10^3 pfu、2日目 9.5×10^3) より明らかに高い値を示した。

D. 考察

フェレットおよびネコの各臓器から増幅された ACE2 部分配列 (952bp) の産物量は臓器によって異なっていた。ヒトでは ACE2 が血圧調整に関わることから心臓、腎臓、血管内皮に多く発現していることが確認されており、今回の PCR の結果が発現量と相関していることが推測された。フェレットとネコでは検出臓器に違いがあり、特にフェレットでは肺からの増幅産物が認められなかった。SARS-CoV の標的臓器とされている肺での ACE2 発現に関してはさらなる解析が必要と思われる。

ACE2 アミノ酸配列を比較した結果、identity および similarity のどちらもフェレットとネコの間が最も高い値を示した。未だ解明されていない ACE2 内の SARS-CoV Binding Site が決定されれば、アミノ酸配列から、動物種による SARS 感受性を予測することが可能になるかもしれない。

フェレットの ACE2 を発現させた HeLa 細胞に SARS-CoV を接種したところ、ウイルスが増殖することが明らかとなった。このことから、フェレットの ACE2 は SARS-CoV のレセプターとして機能することが強く示唆された。今後、発現細胞のクローニングを行い、詳細な解析を進めるとともに、ネコについても検討する予定である。

E. 結論

フェレットおよびネコの ACE2 はヒトのそれと高いホモロジーがあることが明らかとなった。また、フェレットについては SARS-CoV のレセプターとして機能することが強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

座本綾、田口文広、福士秀悦、森川茂、杉山広、田原口元子、山田靖子フェレット ACE2 の同定と SARS-CoV レセプターとしての機能。第 139 回日本獣医学会学術集会。和光市。平成 17 年 3 月。

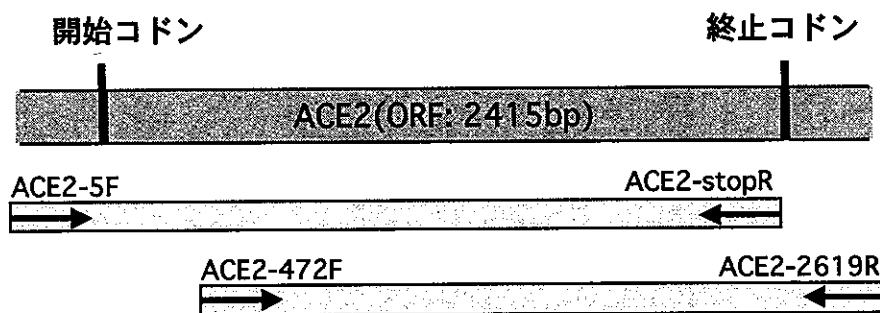


図1.増幅に用いたプライマーの設定部位

ACE2 の前半約 2500bp と後半約 2200bp をターゲットに PCR を行い、その増幅産物をダイレクトシーケンスに用いた。

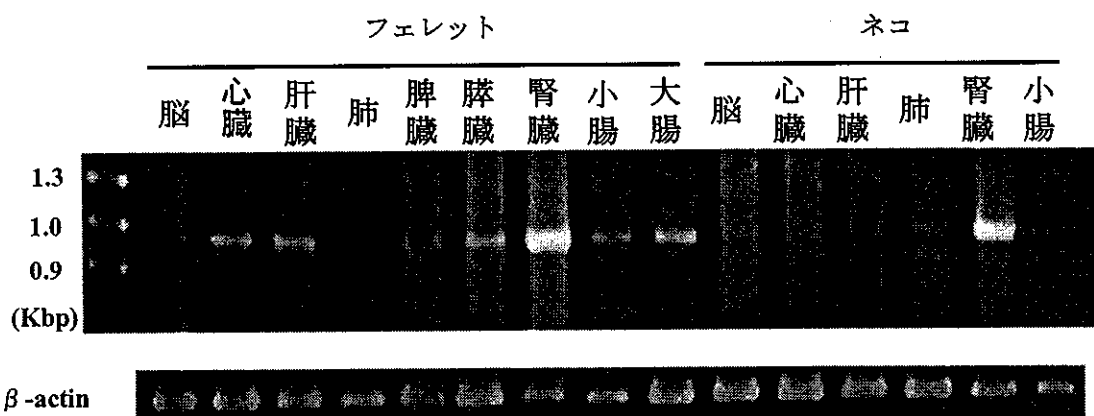


図2. 各臓器から抽出した mRNA を材料とした PCR の結果

ACE2 の部分配列 952bp をターゲットに PCR を行った。コントロールの β -actin については、フェレットおよびネコの β -actin の共通配列部分に設定したプライマーを用いて PCR を行った

表1. 各動物種間における ACE2 アミノ酸配列のホモロジー

各動物種の ACE2 の全長 805 アミノ酸残基について、ClustalW を用いて比較解析を行った。

	Human	Ferret	Cat	Mouse	
Human	-	82.6	85.2	82.1	
Ferret	96.5	-	89.7	81.5	% of identity
Cat	97.1	98.5	-	81.7	
Mouse	97.3	97.0	98.1	-	
% of similarity					

Human	MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN	90
Cat	..G.F....FA.L.....T.L.....E.....E.S.....D...K.E.A....YE...K.KT...A.H.	90
Ferret	.LG.....A.L.....T.DL.....E...Y...E.S.N.....D..I.K..I..A....YE.E.QH.KT...E..D	90
MouseT...LT..N.....NN..Q.....S.....A.K.SE.AA....YE...KT..SFS....T	90
Human	LTVKQLQALQQNGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLY	180
Cat	T...R.....S.....A..Q.....A.....A..N.....DD..E..K.....G..A.....	180
Ferret	PII.R..R...S.....A..RE.....A.....A..N.....DD..E..K.....G.....	180
Mouse	PII.R.....S...A..A..N.Q.....K.....D...T.T...S.....G..A.....	180
Human	EEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDM	270
Cat	...A.....N.....EEWT...N..S...K....TQ...Q.....DT...R...T.....	270
Ferret	...A.....N.....EEWA...S..N.....TQ.....D...R...T.....	270
MouseN.N.....AE.A...N.N.N.....R..A.....R...DT...T.....	270
Human	WGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIKFEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRLM	360
CatP.....N.S...R.....E..DSR.V.....K.....	360
FerretP.M..R.....N.S...R..E..T.....E..Q...E..DNR.V.....R...K.....	360
MouseP.....A.....MN.G...E...Q.....H.....A...E.ADGR.V.....H...K.....	360
Human	CTXVTMDDFLTAHHEMGIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIIVGTL	450
CatV.....N..T.....G.S..S.....	450
FerretE.....N..N...P...S..S..D.....	450
MouseN.....R.....PS.....S.....	450
Human	PFTYMLEKWRWVVFKEGIPKDWKMKWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQALCQAAKHEGPH	540
CatE...Q.....A.....I.....RI.....	540
FerretE..Q.....D.....L.....A..A.....I.....I.....Y.....	540
MouseR.....E.....L.....I.....YN.S..	540
Human	KCDISNSTEAGKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNRPLLNYFEPLFTWLKDNKNSFVGWSTWSPYADQSIKVRISLKSALGD	630
CatS..K..LQ..T...K.....H...E.K..T...K.....E..R...N..R.....	630
FerretS.....HE..S..R.K..F..R.....T.D.....E..R...N.....E.....	630
MouseLK..S..N...K.....R..D.K...Q...D...E..R...N.E.....A.....	630
Human	KAYEWNDEMFLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMLFGCEEDVRVANLKPRI SFNFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDN	720
Cat	E.....E..S.....T.P.V.DN.W.S.....S.....V...S...E.....D.....	720
FerretF.Q..I.....E..S.....T.P.VGK...SD.....I..S.E.M....AD..E..K..G.....D..	720
Mouse	N...TN...F.....K..SII...TVP.L.....SD...V..Y...S.Q...V...S...D.....G...V.G...	720
Human	SLEFLGIQPTLGPNNQPPVSIWLVFVVMGVIVVGVILIFTGIRDKKNKARSNGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF	805
CatS..Y...T.....V...L.VS...N.R.N.Q...E.....V.L.....HA.....	805
FerretE..Y...T.....V...FL...S...N.R.N.Q...E.....V.L.....V.....	805
MouseH..E..Y...T...I...ALV...I...V...KG...ETKRE...D.M..G...S.A...S..A...	805

図 3. 各動物種の ACE2 アミノ酸配列

既に報告されているヒトおよびマウスの配列と比較した。

(GeneBank accession number; Human NM_021804, Mouse BC026801)

猫コロナウイルス感染症に関する研究
—猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) 感染と抗体介在性感染増強 (ADE) —

研究要旨 猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) には2種類の血清型が存在し、抗体の介在によりその感染が増強される。この抗体介在性感染増強 (ADE) は、主に S 蛋白質に対する抗体によって誘導され、しかも、中和活性と密接な関係にあることが報告されている。本研究では、この ADE 活性の発現機序をより詳細に解析することを目的に、ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与と ADE 発現と血清型の関係を調べた。まず、FIPV の猫マクロファージにおける ADE 発現に、ウイルスレセプターに対するモノクローナル抗体の存在がどのように影響するのかを調べた。その結果、ADE 発現にはウイルスレセプターは必要なく、そのメカニズムとしては Fc レセプターを介したエンドサイトーシスが考えられた。また、Fc レセプター陽性でウイルスレセプター陰性の U937 細胞でも ADE 活性が誘導された。血清型の違いと ADE 発現の関係を調べるために、SPF 猫に I 型あるいは II 型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫し、I 型 FIPV を接種することにより *in vivo* において ADE が誘導されるか否かを調べた。I 型 FIPV 抗体を受身免疫した猫でのみ、同じ血清型の I 型ウイルスの感染に対して明らかに FIP 発症が増強された。すなわち、FIPV 感染の場合、同じ血清型のウイルスの再感染で ADE が発現することが示唆された。

分担研究者 宝達 勉
北里大学獣医畜産学部
助教授

両者には密接な関係があることが明らかとなっている。しかし、このような ADE に関する研究は、組織培養が容易な II 型 FIPV を用いた *in vitro* での研究結果であり、細胞での増殖性が悪い I 型 FIPV に関しては明らかにされていない。また、*in vitro* での試験結果と同様にネコ生体内 (*in vivo*) でも同じ血清型のウイルス感染に対してのみ ADE が起こるか否かも明らかでない。

そこで、本年度の研究では、1) ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与を調べると共に、2) 血清型の違いと ADE 発現の関係を調べた。

A. 研究目的

猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) は、抗体の介在によりその感染が増強される。FIPV 感染における抗体介在性感染増強 (ADE) は、ウイルス抗体複合体が抗体の Fc 部分に対する Fc レセプターを介して細胞に侵入することによって起こる。しかし、この ADE 発現に細胞表面の FIPV ウイルスレセプターが関与しているかどうかは明らかでない。また、FIPV には I 型と II 型の血清型が存在し、II 型 FIPV 感染血清は同じ血清型である II 型 FIPV の感染を増強することが *in vitro* の実験で明きからとなっている。II 型 FIPV の Spike (S) 蛋白質を認識するモノクローナル抗体 (MAb) を用いた解析ではウイルスの中和活性と ADE 活性に相関性が認められ、

B. 研究方法

1) ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与

SPF 猫の肺胞マクロファージにウイルスレセプター (猫アミノペプチダーゼ) に対するモノクローナル抗体 (Mab) を反応後、ADE 活性をもつ Mab (抗 S 抗体) を