

200400598A

厚生労働科学研究費補助金

平成16年度

新興・再興感染症研究事業

SARSコロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究
(H16—新興—11)

研 究 報 告 書

平成17年3月

主任研究者 森川 茂
(国立感染症研究所)

目 次

1. SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究 …………… 1
主任研究者：森川 茂 (国立感染症研究所・ウイルス第1部)
2. 組換え SARS-CoV 抗原を用いた血清診断系の開発 …………… 15
分担研究者：森田 公一 (長崎大学・熱帯医学研究所)
3. VSV-pseudotype による SARS-CoV 迅速中和抗体測定法の開発 …………… 21
主任研究者：森川 茂 (国立感染症研究所・ウイルス第1部)
4. シュードタイプバキュロウイルスによる中和抗体測定系の開発 …………… 27
分担研究者：松浦 善治 (大阪大学・微生物病研究所)
5. SARS 迅速診断キット開発のための基礎的研究 …………… 29
分担研究者：奥野 良信 (大阪府立公衆衛生研究所・感染症部)
6. SARS/RT-LAMP 検出試薬開発と臨床評価 …………… 33
分担研究者：田代 真人 (国立感染症研究所・ウイルス第3部)
7. LAMP 法による SARS 診断法の改良 …………… 41
分担研究者：納富 継宣 (栄研化学株式会社・生物化学研究所)
8. SARS 鑑別診断法の開発に関する研究 …………… 47
分担研究者：北村 義浩 (東京大学・医科学研究所)
9. SARS-CoV 感染動物モデルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析 …… 49
分担研究者：長谷川秀樹 (国立感染症研究所・感染病理部)
10. ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの作出 …………… 57
分担研究者：棚林 清 (国立感染症研究所・獣医科学部)

総括研究報告書

1. SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長 森川 茂

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は、2003年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症で、感染症法の改正で指定感染症から1類感染症に見直された。国立感染症研究所では、SARS発生後、直ちに研究チームを立ち上げて SARS-CoV 培養抗原を用いた SARS-CoV 特異抗体検出法を確立し、RT-PCR によるゲノム検出を行い、WHO-collaborative network により配布された検体、SARS-CoV 等を用いて検出感度等を明らかにした。また、日本では SARS 発生直後から水際での懸命な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国においても感染者が発生する可能性を想定して対応することが必要である。一方、SARS コロナウイルス(SARS-CoV)を扱っている海外（シンガポールと中国）の研究室で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでた。このことから、実験室診断、特に血清診断に用いる抗原調製に大量の SARS-CoV の培養を行う必要の無い組換え抗原を用いた診断系の開発も急務である。RT-LAMP や RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出は高感度であるが、未だ改良の余地がある。類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断も院内感染対策、公衆衛生学の観点から必要である。また、SARS-CoV の感染モデル動物の開発は、病原性の解明、ワクチンや抗ウイルス薬の有効性試験に活用できるだけでなく、感染後のウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である。本研究ではこれらを目指し研究を行い、初年度の研究成果として、以下の成果を得た。

SARS-CoV 培養抗原の作製は BSL3 レベルで行う必要があり、さらにウイルスの不活化を確認しないと用いることが出来ない。そこで、安全に抗原を調製するために、SARS-CoV の組換え N 蛋白を発現、精製して抗体検出 ELISA を確立した。特に他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで、特異性を高めることに成功した。また、迅速なイムノクロマト法に用いる抗体を得るため、SARS-CoV の構造蛋白である S、M、N、E 各蛋白のペプチドに対する単特異抗体を作製した。抗体検査の gold standard であるウイルス中和抗体測定法は BSL3 で行う必要があり、さらに結果が出るまでに3日間かかる。そこで、安全かつ迅速にウイルス中和抗体を測定するために、SARS-CoV の外被蛋白（S 蛋白）を被った VSV-pseudotype を作製した。この VSV-pseudotype は、SARS-CoV のレセプターであるアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）依存的に感染した。この VSV-pseudotype を用いて SARS-CoV 特異的な中和抗体測定が 10 時間で可能になった。また、外被蛋白(gp64)遺伝子を欠失し ACE2 を被せた gp64(-)バキュロウイルスを作製した。この組換えバキュロウイルスは、SARS-CoV の S 蛋白依存的に効率良く感染した。SARS-CoV ゲノム検出に関しては、LAMP 法により RT-PCR よりも迅速かつ高感度

にゲノム検出ができることを明らかにした。また、LAMP 法の感度向上を目的として、SRAS-CoV の遺伝子の他の領域のプライマーを検討した結果、nuc28,000 の領域のプライマーセットがより迅速に検出可能であった。また、ゼオライトパウダーを核酸吸着担体とした、抽出 RNA を全量反応に持ち込める新規な抽出方法を開発した。現行法で採用していたカラムを用いた方法に比べ10倍以上の高感度化を達成した。一方、類似の症状を呈する呼吸器感染症との迅速鑑別診断法を開発するため、今年度はインフルエンザウイルス A、B、ヒトコロナウイルスの3種類を標的として、バイオインフォマティクスのコンピュータ解析によって、設計したプライマーセットによる増幅効率、特異性を検討した。SARS-CoV 感染動物モデル系としてカニクイサルに、経鼻接種または静脈内接種により SARS-CoV を感染させたところ、いずれの感染経路でも、咽頭拭い液、直腸拭い液からウイルス遺伝子が検出され、感染後 10 日目以降に血清中の中和抗体および IF 抗体が検出された。サルは SARS-CoV に感染するもののウイルスは比較的速やかに排除され発症しない。そこで、効率のよい SARS-CoV 感染モデル動物を開発するために、ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの作出を試みた。導入遺伝子(ヒト ACE2) DNA の一部が PCR により陽性であった個体のうち 3 系統においてヒト ACE2 の発現がウエスタンブロット法により確認できた。

分担研究者：

- 奥野良信 (大阪府立公衆衛生研究所部長)
- 北村義浩 (東京大学医科学研究所感染症分野助教授)
- 田代真人 (国立感染症研究所ウイルス第3部部长)
- 棚林清 (国立感染症研究所獣医科学部室長)
- 納富継宣 (栄研化学株式会社生物化学研究所第2部部长)
- 長谷川秀樹 (国立感染症研究所感染病理部室長)
- 森田公一 (長崎大学熱帯医学研究所病原体解析部門分子構造解析分野教授)
- 松浦善治 (大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター教授)

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は、2003

年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症で、感染症法の改正で指定感染症から1類感染症に見直された。日本では、水際での懸命な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国においても感染者が発生する可能性を想定して対応することが必要である。また、今後インフルエンザの流行に重なって日本で SARS 患者の発生があった場合、実験室診断の重要性ははるかに大きくなると考えられる。これまでに SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 特異抗体は、発症後 9 日程度から検出できること、抗体応答前にはウイルス直接検出法として RT-PCR, LAMP 法等によるウイルス遺伝子検出が有効であるが、検出率が必ずしも高くないことが明らかとなっている。一方、SARS-CoV を扱っている海外(シンガポールと中国)の研究室で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでた。このことから、実験室診断、特に血清診断に用いる抗原調製に大量の

SARS-CoV の培養を行う必要の無い組換え抗原を用いた診断系の開発も急務である。また、類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断も院内感染対策、公衆衛生学の観点から必要である。また、SARS-CoV の感染モデル動物の開発は、病原性の解明、ワクチンや抗ウイルス薬の有効性試験に活用できるだけでなく、感染後のウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である。本研究では、抗体検出感度を上げて抗体検出までの window 期間を短縮すること、抗体検出法の迅速化、安全なウイルス中和抗体測定法の開発、ウイルス遺伝子・蛋白の検出法の改良と至適サンプルの検討を行い、SARS の実験室診断の精度向上と迅速化を行うことを目的とするが、本年度は、特にウイルス培養の必要のない組換え抗原による抗体検出法の開発、SARS-CoV を用いない安全なウイルス中和抗体測定法の開発、LAMP 法による SARS-CoV 検出の至適化と改善、ACE2-トランスジェニックマウスの作製、サルへの SARS-CoV 感染系の解析、イムノクロマト法の開発のための抗体作製、鑑別診断法の開発のための基礎研究を行った。

B. 研究方法

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた血清診断系の開発：

SARS-CoV の N 遺伝子 cDNA を pQE30 プラスミドに挿入した。サイトの 5' 末端側には His-tag が付加される。また、N 末端から 121 残基を除いた N_{Δ121} も同様に作製した。IPTG 誘導により組換え蛋白を発現し、TalonTM IMAC resin column により精製した抗原を 0.13 μg/well で 96 穴の ELISA プレートにコートして通常の ELISA を行った。対象とする健康人血清は、SARS の流行以前 2001 年度～2002 年度にベトナム

で無作為的に採取されていた 175 人の健康人血清を用いた。患者血清は 37 人の SARS 確定例から経時的に採取されたサンプルを使用した。また、ハノイの SARS 指定病院であった French Hospital に 2003 年の 3 月 11 日～4 月 3 日まで勤務し SARS 患者の治療・看護にあたった医師、看護師のうち無症候であった 112 名から採取した血清も用いた。

(2) VSV-pseudotype による SARS-CoV 迅速中和抗体測定法の開発：

SARS-CoV の S 遺伝子 cDNA を pKS336 にクローニングした (pKS-S)。また、S 蛋白の C 末端側の細胞質ドメイン 19 アミノ酸を欠損させた S 遺伝子 cDNA を pKS336 にクローニングした (pKS-St19)。これらは、哺乳類細胞で EF-BOS プロモータにより S 蛋白を発現する。これらを 293T 細胞にトランスフェクトし、Dr.Whitt より分与された VSVΔG*-G ウイルス (VSV ウイルスの膜タンパク質を欠き、代わりに GFP 遺伝子を組み込んである) を感染させ、SARS-CoV S 蛋白質を被った VSV シュードタイプウイルスを回収した。シュードタイプウイルスを Vero E6 細胞に感染させ、蛍光顕微鏡を用いて GFP の発光を指標に感染を確認した。また、蛍光顕微鏡下で細胞を写真撮影後、GFP 発現細胞数を ImageJ software で測定した。

(3) ACE2 を被ったシュードタイプバキュロウイルスの作製：

バキュロウイルスの本来のエンベロープ蛋白質である gp64 の遺伝子を相同組換えにより欠損させたウイルスゲノムをもつバクミドを作製した。さらにこの組換えウイルスゲノムの多角体遺伝子領域に、多角体プロモーターと CAG プロモーターの下流にそれぞれ ACE2 遺伝子とルシフェラーゼ

遺伝子を組み込んだ組換えウイルスゲノムをもつバクミドを作製した。この組換えバクミド DNA を昆虫細胞に導入して培養上清中からシュードタイプウイルスを回収し、濃縮・精製した。ウェスタンブロットによってシュードタイプウイルスの ACE2 蛋白質の取り込みを、またルシフェラーゼ活性により哺乳動物細胞への遺伝子導入を検討した。

(4) SARS 迅速診断キット開発のための基礎的研究：

イムノクロマト法による迅速診断法を開発するための抗体作製を行った。SARS コロナウイルスの構造蛋白質 (S、E、M、N) で、抗原性を有すると考えられるペプチドをサーチした。有力な候補の中から、それぞれの蛋白質について 1~2 種類のペプチドを選択し合計 5 種類のペプチドを合成した。各ペプチドを 2 匹のウサギに免疫した。0、2、4、6 週に免疫し、7 週目に ELISA で抗体価を測定し、8 週目に全採血した。この血清を用いて、ウイルス中和試験、感染 Vero E6 細胞免疫染色により、ペプチド抗体の反応性を検討した。

(5) SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性の検討：

栄研化学株式会社で製造した SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性を国立感染症研究所ウイルス第 3 部自家製 RT-PCR 試薬、香港中文大学医学部自家製 RT-PCR 試薬、香港特別行政区衛生部ウイルス部門 自家製 RT-PCR 試薬と比較検討した。検体は、香港、ベトナムの SARS 患者および接触者から様々な日時に採取した、血清(血漿)、咽頭拭い液・咽頭鼻腔拭い液、糞便などを用いた。

(6) RT-LAMP 法の改良のための基礎研

究：

栄研化学株式会社で現行開発済みの試薬のプライマーは SARS-CoV ゲノムの塩基配列番号 18000 近辺の領域に設定している。本年度の研究では、感度向上を目的として、9,000 付近、14,000 付近及び 28,000 付近を中心にプライマー設計を行い、感度を比較した。また、逆転写工程を改善するために、21 種類の逆転写酵素を比較検討した。現在ウイルス RNA の抽出には、QIAGEN 社の RNA 抽出キットを用いているが、抽出 RNA の 10 分の 1 しか増幅反応へ持込めない。そこで本年度は検体の濃縮を兼ねた新規ウイルスゲノム抽出法の検討を行った。

(7) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の開発に関する基礎研究：

SARS-CoV と鑑別すべき対象ウイルスとして A 型・B 型インフルエンザウイルス (Flu-A、Flu-B) とヒトコロナウイルス (hCoV) を選んだ。上記の対象ウイルスのほか HIV (p24 領域) に対して複数の RT-LAMP 法用のプライマーセットをデザインし、実際にそのプライマーセットが対象とする微生物ゲノムを検出できるかどうかを real-time PCR 機を用いて対象核酸の増幅による CyberGreen の蛍光強度上昇をモニタリングした。プライマーセットの感度を客観的に調べるために対象ウイルスの増幅対象領域のいずれか 1 つと HIV の p24 領域を有するレトロウイルスベクターを作製した。このベクター粒子から RNA を調製し、これを試料として RT-LAMP 法で核酸検出を行った。

(8) SARS-CoV 感染カニクイサルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析：

SARS-CoV を経鼻、気管内、静脈内、胃内接種したカニクイサルから接種後 1 日おきに血液、咽頭、鼻腔、直腸拭い液を採取

した。各拭い液と末梢血単核系細胞からのウイルス分離および感染性ウイルス量を測定した。ウイルス RNA 量の定量には、Light Cycler SARS-CoV quantification kit (Roche) を用いた。抗体応答の解析には、SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞塗抹標本を用いた間接蛍光抗体法とウイルス中和試験を行った。過麻酔による安楽殺を行い、心臓採血後解剖し、組織を採取し常法どおり 10%ホルマリン緩衝液固定後にパラフィン切片組織を作製し病理学的解析を行った。

(9) ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの作出：

ヒト腎細胞由来である 293 T 細胞 RNA を鋳型に RT-PCR により増幅したヒト ACE2 cDNA を、哺乳類細胞での発現プラスミドベクター pCAGGS-P7 にクローニングした。このプラスミドのプロモーターからポリ A 付加領域を含む DNA 断片をマウス(C57BL/6J)の受精卵にマイクロインジェクションした後、仮腹マウスに移植、妊娠させ子孫マウスを得た。導入 DNA 断片を有する個体と同系統マウスとの交配により得られた子孫マウスの各種臓器について、ヒト ACE2 遺伝子および蛋白の発現の確認を RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により行った。

(倫理面への配慮：ヒト検体の使用に当っては、各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た。動物実験は、各研究機関の動物実験委員会の承認を得た。)

C. 結果

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた血清診断系の開発：

大腸菌で発現、精製した SARS-CoV の N および N_{Δ121} 蛋白を抗原とした ELISA 法で健康人血清について非特異反応を検討した結果、N 蛋白では 175 名の健康人中擬陽

性が 38 名 (約 20%)、N_{Δ121} 蛋白では 11 名 (6%) となり、アミノ酸の一次配列から予測されたごとく SARS-CoV N 蛋白の N 末端にあるコロナウイルス共通配列により既知のヒトコロナウイルス感染により産生された抗体が SARS-CoV N 蛋白と反応する可能性が示唆された。このことは、ウエスタンブロット法でも確認できた。また N_{Δ121} 蛋白では非特異反応での抗体価の上限が低いことから cut off 値を適切に設定すれば擬陽性を殆どなくすることが可能である。そこで、N_{Δ121} 蛋白を用いた ELISA 法でベトナム人 SARS 患者血清の抗体を測定した。対象として CDC から提供された SARS-CoV 感染細胞から作製した抗原を用いた ELISA も同時に実施した。その結果、37 名の SARS 患者血清中、CDC のウイルス抗原では 21 名 (約 56%) が陽性であったのに比べて N_{Δ121} 蛋白では 36 名 (約 97%) が陽性となった。また抗体価においても CDC の SARS ウイルス感染細胞抗原では 400 倍～6,400 倍の値であったのに対して、N_{Δ121} 蛋白抗原では 600 倍から 204,800 倍であった。このことは N_{Δ121} 蛋白による ELISA 抗体検出系が極めて高感度であることを示している。次に、N_{Δ121} 蛋白を用いた ELISA 系を用いて SARS 発症から抗体価検出が可能となる時期の検討を行った結果、発症後 1 週での抗体陽性率は約 22%、2 週目で約 70%であり 100%となるのは発症後 3 週を経過した後であった。また、SARS 患者と接触のあった医療従事者 149 名で臨床的に SARS を発症しなかった 112 名のうち N_{Δ121} 蛋白 ELISA で 4 名が陽性になった。この 4 名の血清はウイルス中和抗体も陽転していた。このことはベトナムでは医療従事者の不顕性感染が確実に発生していたことを示しており、ベトナムでは顕性感染率は 24.8%、不顕性感染率は 2.7%と算出された。

(2) VSV-pseudotype による SARS-CoV 迅速中和抗体測定法の開発：

SARS-CoV-S または、SARS-CoV-St19 蛋白質発現 293T 細胞に VSVΔG*-G ウイルスを感染 24 時間後、培養上清を回収して、SARS-CoV 感受性細胞である Vero E6 に感染させ、GFP の発現を調べた。その結果、C 末端の細胞質ドメイン 19 アミノ酸を欠失した S 蛋白質(St19)を発現させた細胞からのみ Vero E6 細胞に感染性を有する VSV シュードタイプが得られた。この VSV シュードタイプ(VSV-SARS-St19)を Vero E6 細胞に接種し GFP の発現を経時的に測定したところ、感染後 7 時間で GFP 発現細胞数の定量が可能であった。VSV-SARS-St19 の Vero E6 細胞への感染は、ウサギ抗 SARS-CoV 血清で中和され、その感度は SARS-CoV / Vero E6 細胞系を用いた中和試験と同等であった。また、SARS-CoV のレセプターである ACE2 に対する抗体で予め Vero E6 を処理すると VSV-SARS-St19 の感染が阻害されることから、VSV-SARS-St19 の感染はレセプターである ACE2 依存的であるか明らかになった。

(3) ACE2 を被ったシュードタイプバキュロウイルスの作製：

ACE2 シュードタイプバキュロウイルスゲノムを昆虫細胞に導入したところ、昆虫細胞表面に ACE2 が発現されることを確認した。また、その培養上清中より回収した ACE2 シュードタイプバキュロウイルスからは、ACE2 が検出され、ACE2 がバキュロウイルス粒子上に取り込まれていることが示された。一方、バキュロウイルス本来のエンベロープ蛋白質である gp64 は検出されなかった。この ACE2 シュードタイプバキュロウイルスの哺乳動物細胞への感染性を評価したところ、SARS-CoV の S 蛋

白質を発現する細胞にのみ感染することができ、発現しない細胞には感染できないことが示された。また、抗 ACE2 抗体により感染が特異的に中和された。

(4) SARS 迅速診断キット開発のための基礎的研究：

SARS-CoV のペプチドの免疫 7 週後のウサギ血清の各ペプチドに対する ELISA 価を測定した結果、ホモペプチドと濃度依存的に反応し、ペプチドに対する抗体の産生が確認できた。これらのペプチド抗体はすべてウイルス中和活性を認めなかったが、染色試験により E 蛋白質の抗ペプチド抗体がウイルス感染細胞と特異的に反応した。

(5) SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性の検討：

今回検討したベトナムからの送付検体は、感染患者との接触者のものであり、症状を呈していないヒト由来のものである。しかし、この中には時間経過とともに血清抗体が陽性となったものもあり、これらは不顕性感染であったと判断される。これら 279 検体 (141 名分の検体) を感染研での自家 RT-PCR 法と RT-LAMP 法で比較した結果、前者では 1 例のみ陽性で後者では 30 検体が陽性を示した。このことから、RT-LAMP 法の感度が極めて高いことが明らかとなった。WHO からのパネル検体でも、同様に RT-LAMP 法の方が検出可能なサンプルが多かった。また、無症状の患者接触者の検体から比較的多くの陽性例が検出できた事に疫学的な意義があり、不顕性感染の実態を調査する意味で重要である。香港中文大学、香港特別行政区政府衛生署に依頼して行った結果では、それぞれの期間での自家 RT-PCR 法と同程度の感度であったが、自家 RT-PCR では RNA を濃縮したり、また LAMP 法ではサンプルを複数回凍結融解

した検体を用いて行ったりしているため、実験室内の交叉汚染による擬陽性の問題等も考慮すると、RT-LAMP 法の有用性は疑いが無い。

(6) RT-LAMP 法の改良のための基礎研究：

LAMP 法に用いるプライマーの改良を目的として、SARS-CoV の塩基配列番号 9,000、14,000、28,000 近辺の領域でそれぞれプライマー設計を行った。その結果、いずれの領域でも増幅可能であったが、塩基配列番号 28,000 で設計したプライマーセットがより迅速に検出可能であった。LAMP 法に用いる逆転写酵素による感度を 21 種の逆転写酵素で比較した結果、現行酵素と少なくとも同等の反応性を有するものを 7 種類見出した。ウイルス RNA 抽出方法の検討を RNA ウイルスである HCV をモデルとして検討を行い、ゼオライトパウダーを核酸吸着担体とした、抽出 RNA を全量反応に持ち込める新規な抽出方法を開発した。現行法で採用していたカラムを用いた方法に比べ 10 倍以上の高感度化を達成した。

(7) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の開発に関する基礎研究：

RT-LAMP 法による核酸増幅を Real-Time PCR で蛍光強度をモニタしたところ測定強度基線が揺らぐため反応開始後何分経過したところで対象核酸の増幅が真に検出され始めたが不明確であることが明らかになった。そこで蛍光強度曲線の一次微分関数を利用して真の蛍光強度の立ち上がりを判定するアルゴリズム・プログラムを作成した。HIV の p24 領域を有するキメラ核酸を有するレトロウイルスベクターを作製しこの粒子から RNA を調製した。この試料を RT-LAMP

法で各プライマーを用いて核酸検出をした。これらには常に HIV の p24 領域が含まれているので HIVp24 を対象とするプライマーセットと感度を比較できるシステムであることがわかった。SARS-CoV > HIVp24 > hCoV > Flu-B > FluA の順で感度が良好であった。

(8) SARS-CoV 感染カニクイサルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析：

気管内、経鼻あるいは静脈内接種後のカニクイサルの直腸拭い液からウイルスゲノムが RT-PCR により一定期間検出された。気管内と経鼻接種のサルでは感染性ウイルスの検出は困難であったのに対し、静脈内接種後の動物では感染性ウイルス量は高かった。病理組織学的解析では、気管内接種後 7 日目のサルの肺に最も強い病変が認められた。この肺の肺胞上皮にウイルス抗原が検出され、マクロファージを主体とする炎症性反応がみられた。10⁶TCID₅₀ 量経鼻接種後 7 日目の動物の肺で同様の病変が見られたが軽度であり、鼻腔粘膜上皮の一部でウイルス抗原が検出された。気管内および経鼻接種後 3 週間目に解剖した動物ではウイルス抗原は検出されず、炎症の修復過程である軽度の線維増生が見られるのみであった。静脈内接種後 14 日目の直腸粘膜上皮においてウイルス抗原が検出されたが、肺病変は認められなかった。腸内でウイルスが増殖している場合に感染性ウイルスが検出され、上気道でのみウイルスが増殖している場合は飲み込んだウイルスは胃、腸管で不活化されるため、ゲノムのみが検出されている可能性がある。SARS の流行時に患者からの SARS-CoV の分離と血清学的診断が試みられ、RT-PCR によるウイルスゲノムの検出は 6~14 病日の便サンプルが最も効率が良かったと報告されている。この疫学調査の結果とサル実験の結果はよ

く一致した。また、患者血清中の中和抗体は 14~21 病日以降上昇が観察されたと報告されており、これもサル実験の結果と一致した。

(9) ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの作出：

ヒト ACE2 発現プラスミドのプロモーターとヒト ACE2cDNA の融合 DNA 断片をマウス(C57BL/6J)の受精卵にマイクロインジェクション後、仮腹マウスに移植し、子孫マウスを得た。出生マウスのうち、導入 DNA 断片を有する個体と同系統マウスの交配により得られた子孫マウスの摘出臓器におけるヒト ACE2 遺伝子の発現を RT-PCR 法で蛋白の発現をウエスタンブロッティング法で調べた。3 系統のマウスで骨格筋や心臓において明らかな RT-PCR での増幅バンドが認められた。また、食道や脳にもシグナルが見られる系統もあった。これらのマウス臓器におけるウエスタンブロッティング法によるヒト ACE2 蛋白の発現を調べたところ、骨格筋や心臓で発現が認められた。また、弱いながらも肺においてシグナルが認められた個体もあった。

D. 考察

SARS は、中国で発生後、短期間の間に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症で、感染症法の改正で指定感染症から 1 類感染症に見直された。日本では SARS 発生直後から水際での懸命な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国においても感染者が発生する可能性を想定して対応することが必要である。一方、SARS-CoV を扱っている海外の研究室で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでた。このことから、実験室診断、特

に血清診断に用いる抗原調製に大量の SARS-CoV の培養を行う必要の無い組換え抗原を用いた診断系の開発も急務である。ウイルス遺伝子検出法は高感度であるが、改善の余地はあると思われる。類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断も必要である。また、SARS-CoV の感染モデル動物の開発は、病原性の解明、ワクチンや抗ウイルス薬の有効性試験に活用できるだけでなく、感染後のウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である。本研究ではこれらを目標に研究を行い、初年度の研究成果として、以下の成果を得た。

安全に抗原を調製するために、SARS-CoV の組換え N 蛋白を発現、精製して抗体検出 ELISA を確立した。特に他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで、特異性を高めることに成功した。また、迅速なイムノクロマト法に用いる抗体を得るため、SARS-CoV の構造蛋白のペプチドに対する単クローン抗体を作製した。この抗体を用いて迅速な抗原検出法であるイムノクロマト法の開発を行いたい。抗体検査の gold standard であるウイルス中和抗体測定法は BSL3 で行う必要があり、さらに結果が出るまでに 3 日間かかる。安全かつ迅速にウイルス中和抗体を測定するために、SARS-CoV の外被蛋白である S 蛋白を被った VSV-pseudotype を作製した。VSV-pseudotype を用いることにより SARS-CoV 特異的なウイルス中和抗体測定が 10 時間で可能になった。また、外被蛋白(gp64)遺伝子を欠失し ACE2 を被せた gp64(-)バキュロウイルスを作製した。この組換えバキュロウイルスは、SARS-CoV の S 蛋白依存的に効率良く感染し、luciferase を発現した。これらの系を用いたウイルス中和抗体測定法の評価を臨床検体を用いて次年度以降行う予定である。SARS-CoV ゲ

ノム検出に関しては、LAMP 法により RT-PCR よりも迅速かつ高感度にゲノム検出ができることを明らかにした。また、LAMP 法の感度向上を目的として、プライマーの改良、逆転写酵素の至適化、RNA 抽出法の改善が可能であることを明らかにした。一方、類似の症状を呈する呼吸器感染症との迅速鑑別診断法を開発するため、今年度はインフルエンザウイルス A、B、ヒトコロナウイルスの 3 種類を標的とした RT-LAMP 法開発の基礎データを得た。SARS-CoV 感染動物モデル系としてカニクイサルに SARS-CoV を感染させたところ、いずれの感染経路でも、咽頭拭い液、直腸拭い液からウイルス遺伝子が検出され、感染後 10 日目以降に血清中の中和抗体および IF 抗体が検出された。これらの材料は、今後開発した種々の検査法の評価に用いることができる。より効率のよい SARS-CoV 感染モデル動物を開発するために、ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの作出を試みた。導入遺伝子(ヒト ACE2) DNA の一部が PCR により陽性であった個体のうち 3 系統においてヒト ACE2 の発現がウエスタンブロット法により確認できた。今後、SARS-CoV 感染実験によりその有用性を検討する予定である。これら本年度の研究成果は、より迅速で安全な実験室診断の確立につながるものであり、厚生労働行政に貢献すると考えられる。

E. 結論

SARS-CoV の培養系を使用しない血清診断系により、実験室感染のリスクを回避できる。また、迅速に抗体測定が可能である。有効なイムノクロマト法によるウイルス抗原検出系が確立すれば、臨床の現場で迅速に一次スクリーニングが可能になる。RT-LAMP 法が極めて高感度であるが、検出感度が向上すれば、より確実な診断が可

能となる。また、類似初期症状を呈する感染症との鑑別診断の開発も可能となった。感染サルモデル系で得られた材料を用いて、今後開発、改良された検査法の精度、感度検定が可能となった。また、トランスジェニックマウスは、より有効なモデル動物系の開発につながると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizitani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319: 1228-1234.
- 2) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
- 3) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 5;577(1-2):187-92
- 4) Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y. (2004): A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol.*, 16(10): 1423-30
- 5) 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.: (2005) The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine* (in press).
- 6) Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Fukushi, S., Mizutani, T., Notomi, T., Kanda, H., Minekawa, H., Matsuyama, S., Hoang Thuy Long, Nguyen Thi Hong Hanh, Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S.. (2005): Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods* (in press)
- 7) Kitagawa Y., Tani H., Limn C-K., Matsunaga T., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses. *J.Virol.*, 79:3639-3652 (2005).
- 8) Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.*, 79, 2847-2858 (2005).
- 9) Hong Thi Cam Thai, Mai Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Manmohan Parida, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J.Clin.Microbiol.* Vol.42: 1956-1961, 2004.
- 10) B. L. Haagmans, T. Kuiken, B.E. Martina, R. A. M. Fouchier, G.F. Rimmelzwaan, G.V.Amerongen, D. V. Rhiel, T. de Jong, S. Itamura, K.-H. Chan, M. Tashiro, A.D.M.E. Osterhaus Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature Med.* 10: 1-4, 2004
- 11) L. L. M Poon, C. S. W Leunga, M. Tashiro, K. H. Chan, B. W. Y. Wong, K. Y. Yuen, Y. Guan, J. S. M. Peiris. Rapid Detection of SARS Coronavirus by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Clin Chem.*, 50(6): 1050-2. 2004.
- 12) 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人(2004): SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果. *インフルエンザ (メディカルレビュー社)* 5:35-42.
- 13) 奥野良信: SARS を考慮した今冬のインフルエンザ対策について. *Sysmex Journal*, 26 : 106-113, 2004
- 14) 森田公一: 「新型肺炎 (SARS)」、健康な子ども Vol. 374:42-43,2004.
- 15) 棚林 清、巽 正志、藤田 修、宇田晶彦、山田章雄. SARS コロナウイルスの安定性の検討. *感染症誌* 78:991-992 2004.
2. 学会発表
- 1) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 2) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 3) 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第 52 回日本ウイルス学会

学術集会, 2004年11月, 横浜

- 4) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 5) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 6) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004年12月, 神戸
- 7) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸. Efficient replication of SARS coronavirus on the cells expressing mouse ACE2. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004年12月, 神戸
- 8) 北川善紀, 谷 英樹, 林 昌宏, 松永朋子, 田鍬修平, 森石恆司, 松浦善治: バキュロウイルスを用いたターゲットインクベクターの開発. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 2004年11月21-23日
- 9) 阿部隆之, 森石恆司, 高久洋, 田村慎一, 審良静男, 松浦善治: バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構. 同上
- 10) 棚林 清, 巽 正志, 藤田 修, 宇田晶彦, 山田章雄. SARS コロナウイルスの環境中での安定性の検討. 第 52 回日本ウイルス学会. 2004年11月(横浜)
- 11) 長谷川秀樹, 佐多徹太郎. SARS の病理とその病態. 第 93 回日本病理学会総会 (2004年6月札幌)。
- 12) 2. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS コロナウイルス感染動物モデルの作製. 第 93 回日本病理学会総会 (2004年6月札幌)
- 13) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 原嶋綾子, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004年11月横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
Mizitani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells.	Biochemical Biophysical Research Communication	319	1228-1234.	2004
Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells.	Virology	327	169-74.	2004
Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells.	FEBS letter	577(1-2):	187-92	2004
Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y.	A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice.	Int Immunol.	16(10)	1423-30	2004
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	The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice.	Vaccine		in press	2005

K, Vaccine 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.					
Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Fukushi, S., Mizutani, T., Notomi, T., Kanda, H., Minekawa, H., Matsuyama, S., Hoang Thuy Long, Nguyen Thi Hong Hanh, Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S..	Recombinant nucleocapsid protein- based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS.	J. Virol. Methods		in press	2005
Kitagawa Y., Tani H., Limn C-K., Matsunaga T., Moriishi K., and Matsuura Y.	Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses.	J.Virol.	79	3639-3652	2005
Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y.	Involvement of the toll- like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus.	J. Virol	79	2847-2858	2005
Hong Thi Cam Thai, Mai Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Manmohan Parida, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita.	Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. .	J.Clin.Microbiol.	42	1956-1961,	2004
B. L. Haagmans, T. Kuiken, B.E. Martina,	Pegylated interferon- alpha protects type 1	Nature Med.	10	1-4	2004

R. A. M. Fouchier, G.F. Remmelzwaan, G.V.Amerongen, D. V. Rhiel, T. de Jong, S. Itamura, K.-H. Chan, M. Tashiro, A.D.M.E. Osterhaus	pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques.				
L. L. M Poon, C. S. W Leunga, M. Tashiro, K. H. Chan, B. W. Y. Wong, K. Y. Yuen, Y. Guan, J. S. M. Peiris.	Rapid Detection of SARS Coronavirus by Loop-mediated Isothermal Amplification.	Clin Chem.	50(6)	1050-2.	2004
小田切孝人, 二宮 愛, 板村繁之, 西 藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人	SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果.	インフルエン ザ (メディカ ルレビュー 社)	5	35-42	2004
奥野良信: SARS を 考慮した今冬のイ ンフルエンザ対策 について. Sysmex Journal、26 : 106- 113、2004					
森田公一	新型肺炎 (SARS)	健康な子ども	374	42-43	2004
棚林 清、巽 正 志、藤田 修、宇 田晶彦、山田章雄	SARS コロナウイル スの安定性の検討	感染症誌	78	991-992	2004

2. SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

（分担研究課題：組換え SARS-CoV 抗原を用いた血清診断系の開発）

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨： SARS ウイルス感染者の迅速で安全かつ特異的な血清診断方法の開発をめざしてベトナム人の SARS 患者より分離した SARS ウイルスから、血清診断に利用できる可能性のあるウイルス蛋白質（S、M、E、N 蛋白）の遺伝子 cDNA を遺伝子工学的手法により大腸菌を用いてクローニングし、同じく大腸菌発現ベクターを用いてそれぞれの蛋白質の発現を試みた。その結果、上記4つのウイルス蛋白質のうち、大腸菌発現系では N 蛋白のみが大量生産可能なレベルまでの発現を認めた。この N 蛋白質を用いてベトナム人 SARS 患者血清および SARS ウイルスで免疫したウサギ血清についてウエスタンブロット法を実施した結果、SARS—N 蛋白質はいずれの SARS ウイルス免疫血清とも良く反応した。SARS-N 蛋白の N 末端には他のヒトコロナウイルスと極めてよく似た領域があることからこのアミノ酸配列を除いた SARS-N_{Δ121} を発現させこの蛋白質を用いて Indirect-ELISA 法による抗体検出系を試作しベトナム人 SARS 患者血清でその特異性、感度を検討した。その結果、この診断法は特異性、感度ともに良好な結果であった。このことから大腸菌を用いて作製できる SARS-N_{Δ121} は簡便かつ安価な SARS 特異的血清診断抗原として利用可能であることが実証された。本診断系は先進国のみならず開発途上国でも利用可能な血清診断方法として有望である。

A. 研究目的

SARS ウイルスの迅速診断には感染初期に有効な SARS ウイルス特異的遺伝子増幅検出方法のほかにウイルスが体内から消失したのちも診断が可能であるウイルス特異的抗体検出系（血清診断方法）の双方が必要である。血清診断に関しては 2003 年 4 月に SARS ウイルスが初めて分離・同定されてより、我々の研究室を含めて世界中の研究機関では実験室で培養したウイルスあるいはウイルス感染細胞から作製したウイルス蛋白質を用いた方法が使われてきた。この方法では、生きた SARS ウイルスを不活化（感染性をなくして）してその SARS ウイルス関連蛋白質を利用するものであるが、作製過程では生きたウイルスを使うため P3 実験室などの特殊な研究室

が必要でありまた、当然この作業にあたる研究者は常にウイルス実験室感染の危険がともなうので開発途上国の研究機関で自由にこの方法を利用するには種々の制約が発生している。さらに SARS ウイルス蛋白質には SARS ウイルス以外のヒトコロナウイルスと共通の部分があり、ウイルス抗原をそのまま用いた検査では SARS 感染者以外の既知のヒトコロナウイルス感染者でも陽性（擬陽性）となる可能性が示唆されている。

従って、本研究では 1) 安価かつ安全で開発途上国の研究室でも利用可能な遺伝子工学的手法による血清診断用の抗原の開発、および 2) それを利用した迅速血清診断系の確立を目的としている。

B. 研究方法

1) SARS ウイルス遺伝子のクローニング

2003年にベトナムの SARS 患者から Vero 細胞を用いて分離した SARS ウイルス (Hanoi-1 株) を 15cm² の T-フラスコに培養した Vero-E6 細胞に感染させ、4 日後の感染培養液からキアゲン RNA 抽出キットを用いてウイルス RNA を精製した。ウイルス RNA から RT-PCR 法によりウイルスの S,E,M,N 蛋白質遺伝子 cDNA を増幅してプラスミド、pQE30 vector (Qiagen, Hilden, Germany) のマルチプルクローニングサイトに挿入した。サイトの 5' 末端側には HisTag を導入した。挿入した遺伝子はその全塩基配列を同定した。その後 N 蛋白質については 121 残基を除いた N_{Δ121} も作製した。

2) SARS ウイルス蛋白質の発現と精製

SARS ウイルスの遺伝子断片を挿入したそれぞれのクローンは *E. Coli* strain XL-1 blue に導入し 30 °C で Luria-Bertani (LB) 培養液中、100 µg /ml of ampicillin および 0.2 mM の isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) 存在下で増殖発現を行った。菌体内に発現した蛋白質はまず、ウエスタンブロット法により蛋白質発現の有無を確定した後、菌体を破碎しその遠心上清を Talon™ IMAC resin column を用いて精製した。

3) Indirect-ELISA 法

精製した蛋白質を 0.13 µg/well (炭酸バッファー pH9.6) の量で 96 穴の ELISA プレートにコートし、4°C で一夜放置した。その後、ブロックエースで室温、1 時間ブロッキングを行った後洗浄し、各 Well に 100 倍希釈した血清を入れ、1 時間放置したのち、洗浄し 3 万倍に希釈した抗ヒト IgG ペルオキシダーゼ標識血清と 1 時間室温で反応させた。これを洗浄後、各 Well に 100µl の diluted o-phenylenediamine (OPD) を加えて室温で 10 分間放置したのち 100 µl の 1N H₂SO₄ を添加して反応を停止し、492nm の吸光度を測定した。

4) 患者血清

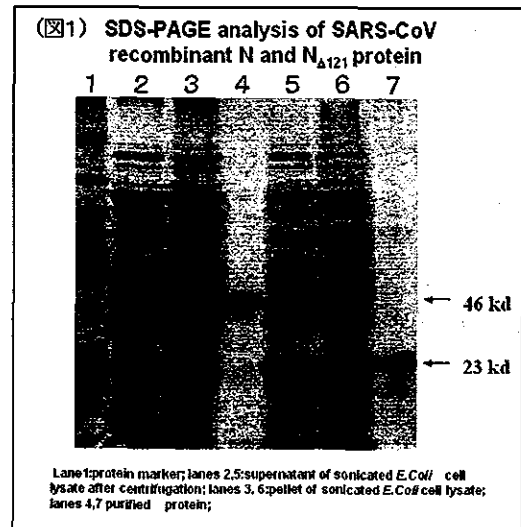
対象とする健康人血清は、SARS の流行以前 2001 年度～2002 年度にベトナムで無作為的に採取されていた 175 人の健康人血清を用いた。

患者血清は 37 人の SARS 確定例から経時的に採取されたサンプルを使用した。また、ハノイの SARS 指定病院であつた French Hospital に 2003 年の 3 月 11 日～4 月 3 日まで勤務し SARS 患者の治療・看護にあつた医師、看護師のうち無症候であつた 112 名から採取した血清も用いた。

C. 結果

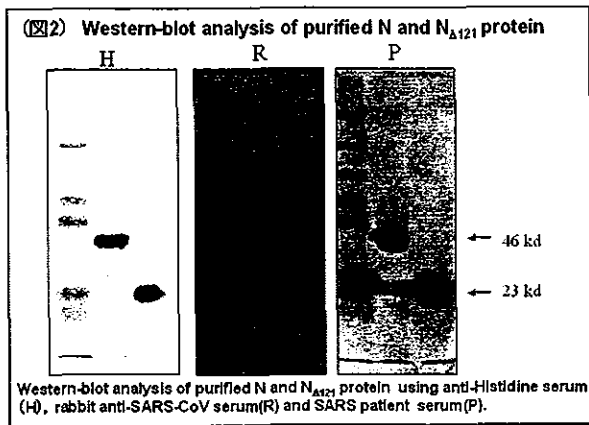
1. 大腸菌での SARS ウイルス蛋白質の発現

SARS ウイルス蛋白質遺伝子、S,E,M,N は全て大腸菌にクローニングすることができた。しかし大腸菌でのそれぞれの遺伝子蛋白質発現では N 蛋白質のみが大腸菌菌体での十分な発現が可能でありしかも可溶性蛋白質として回収することが出来た (図 1)。その他の蛋白質は菌体内で発現してもそれを可溶化することが困難であり (データは示さず)、今回診断用抗原として大量精製することは断念した。



2. N 蛋白質 N 末端の他のコロナウイルスとの共通性と血清診断上の意義

SARS コロナウイルス N 蛋白の N 末端に存在するコロナウイルス間の共通アミノ酸配列の影響を最小限にするため N 蛋白質 N 末端の 121 残基を除いた SARS-N_{Δ121} 蛋白の発現を試みた。その結果この蛋白も図 1 のように大腸菌内で可溶性の蛋白として十分発現することを確認した。SARS-N と SARS-N_{Δ121} の両蛋白質をウェスタンブロット法により抗 HisTag 血清、SARS ウイルス免疫ウサギ血清、SARS 患者血清との反応性を検証した結果、(図 2) のように N と N_{Δ121} 双方ともにこれらの血清と良く反応していることを確認した。



3. N および N_{Δ121} 蛋白のベトナム健康人血清との非特異的反応性

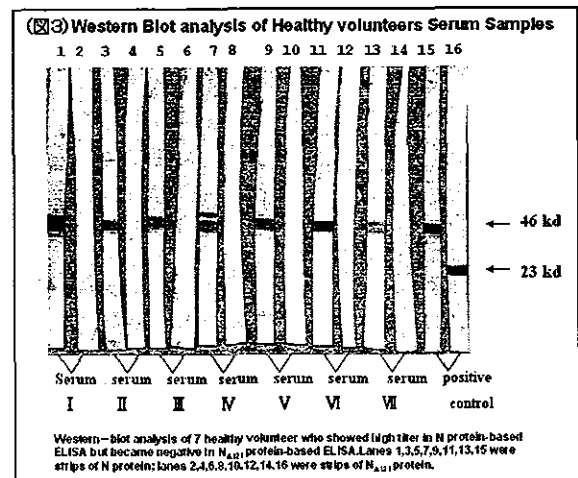
上記の精製した SARS ウイルスの N および N_{Δ121} 蛋白を ELISA 抗原として使用して健康人血清について非特異反応を検討した。その結果を表 1 に示す。ELISA の cut off 値を 100 に設定した場合、N 蛋白では 175 名の健康人中擬陽性が 38 名 (約 20%)、N_{Δ121} 蛋白では 11 名 (6%) となり、アミノ酸の一次配列から予測されたごとく SARS ウイルス N 蛋白の N 末端にある共通配列により既知のヒトコロナウイルス感染により産生された抗体が SARS ウイルス N 蛋白と反応する可能性が示唆された。また N_{Δ121} 蛋白では非特異反応での抗体価の上限は 260 であり cut off 値を 300 に設定すれば擬陽性を殆どなくすることが可能

であることが明らかになった。

(表1) Assessment of recombinant N and N_{Δ121} protein ELISA using health volunteers sera

Method	Total number	Negative	Positive	Positive rate	Highest titer
N-based ELISA	175	137	38	21.71%	3200
N _{Δ121} -based ELISA	175	164	11	6.28%	260

上記の非特異的反応はウェスタンブロット法でも確認した、ELISA 法により擬陽性を呈した健康人のうち 7 名の血清について N 蛋白と N_{Δ121} との反応性を検証した。その結果、図 3 に示すようにこれらの健康人血清は SARS ウイルス N 蛋白 (図 3 中、46kd) とは反応しているが N_{Δ121} 蛋白 (図 3 中、23kd) とは反応性がないか極めて低いことが確認された。これらの結果から N_{Δ121} は SARS の血清診断に有用な遺伝子組み換え蛋白質であることが示された。



4. N_{Δ121} 蛋白を用いた Indirect-ELISA 診断法

上記の N_{Δ121} 蛋白を用いて cut off 値を 300 に設定してベトナム人 SARS 患者血清の抗体測定を実施した。対象として CDC から提供された SARS ウイルス感染細胞から作製した抗原を用いた ELISA も同時に実施した。その結果を表 2 に示す。37 名の SARS 患者血清中

CDC のウイルス抗原では 21 名 (約 56%) が陽性であったのに比べて N_{Δ121} 蛋白では 36 名 (約 97%) が陽性となった。また抗体価においても CDC の SARS ウイルス感染細胞抗原では 400 倍~6400 倍の値であったのに対して、N_{Δ121} 蛋白抗原では 600 倍から 204,800 倍もの値であった。このことは N_{Δ121} 蛋白による ELISA 抗体検出系が極めて感度の高い抗 SARS ウイルス抗体検出系であることをしめしている。

(表2) Assessment of recombinant N_{Δ121} protein ELISA using SARS patients sera

	No. of patients	Positive	Negative	Sensitivity	Titer
NA ₁₂₁ ELISA	37	36	1	97.30%	600~204,800
CDC ELISA	37	21	16	56.76%	400~6,400

5. SARS 感染者の抗 N_{Δ121} 抗体価陽転時期

N_{Δ121} 蛋白を用いた ELISA 系を用いて SARS 発症から抗体価検出が可能となる時期の検討を行った。結果を表 3 に示す。発症後 1 週での抗体陽性率は約 22%、2 週目で約 70%であり 100%となるのは発症後 3 週を経過した後であった。

(表3) Sero-conversion rate by time after onset of illness

Seroconversion time after onset	First week	Second week	Third week
Positive rate	22.22%	69.44%	100%

6. SARS 感染者のケアをした医療従事者での不顕性感染率の評価

SARS 患者と接触のあった医療従事者 149 名で SARS を発症することの無かった 112 名のうち N_{Δ121} 蛋白 ELISA で 4 名が陽性になった。この 4 名の血清をさらにウイルス中和試験を実施したところ 4 例全てでウイルス中

和抗体が陽転していることを確認した。このことはベトナムでは医療従事者の不顕性感染が確実に発生していたことを示しており、ベトナムでは顕性感染率は 24.8%、不顕性感染率は 2.7%と算出された。

D. 結論

1) SARS ウイルス N 蛋白の N 末端部分 121 残基を除いた SARS-N_{Δ121} 蛋白を大腸菌の発現ベクターを用いて発現・精製した。

2) この SARS-N_{Δ121} 蛋白は非特異反応の低い SARS 特異的抗体 (IgG) 検出のための ELISA 法における抗原として利用できることが示された。

3) SARS 患者と接触のあったベトナムの医療従事者のうち顕性感染率は 24.8%であり不顕性感染率は 2.7%であったと算出された。

E. 考察

2003 年に発生した SARS の世界的な伝播と流行では患者の早期発見と隔離が SARS の封じ込めに極めて有効であることがしめされた。迅速血清診断法の開発は遺伝子増幅診断法と並んで患者発生を迅速に検出するうえでも、また SARS ウイルスの血清疫学調査を実施するうえでも極めて重要である。

今回、開発した SARS-N_{Δ121} 蛋白はこの目的を達成するうえで極めて有用な 2 つの特徴を持っている。その 1 つはが特異性の高い ELISA 抗原となること、2 つめはこの N_{Δ121} 蛋白は大腸菌の発現系で多量発現することが可能であり、開発途上国の研究施設でも利用可能な安価で安全な診断抗原であることである。今後この方法を用いた SARS ウイルス IgM 抗体検出系を確立することでさらに特異性の高い迅速血清診断系を確立することが可能であると思われる。

SARS での不顕性感染率についてはすでにいくつかの報告がある。たとえば香港の研究グループは極めて高い値 (15%以上) を報告し、