

シンガポールのグループは低い値 (0.75%) を報告しておりばらつきが多い。これはおそらく前者ではウイルス抗原を使った ELISA 系を用いた為に多くの擬陽性を拾っている可能性が高い。また後者ではウエスタンブロット法を用いているがこれは感度が ELISA の系に比して極端に低く偽陰性が多い可能性がある。不顕性感染の程度については医療機関でのバリアーナーシング技術の優劣により大きく差が開く可能性はあるが一般的には今回の数%程度と見積もるのが妥当ではないかと思われる。いずれにしても SARS 感染では顕性感染率が不顕性感染よりもはるかに多いと結論されるのである。

F. 研究発表 (論文発表)

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.

森田公一：「新型肺炎 (SARS)」、健康な子ども Vol. 374:42-43,2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

3. 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：VSV-pseudotype による SARS-CoV 迅速中和抗体測定法の開発

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長）

協力研究者：福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎（同ウイルス第1部）

研究要旨：SARS コロナウイルス(SARS-CoV)は、既知のコロナウイルスとは全く別の新型コロナウイルスである。このため、組換え遺伝子や蛋白質を用いた診断法の開発、ワクチンの開発、治療用抗血清の開発等が急務である。ウイルス感染の中和試験は SARS-CoV そのものを用いるため、封じ込めができる安全な検査設備(BSL3)が必要である。そこで、我々は SARS-CoV のスパイク糖蛋白質(S 蛋白質)を被った水泡性口内炎ウイルス(VSV)シュードタイプウイルス(VSV-SARS-St19)を作製した。このシュードタイプウイルスは本来の VSV 膜タンパク質をコードする G 遺伝子を欠いていて、膜タンパク質が供給されない限り1回のみ感染可能なので、生物学的封じ込めの観点からも安全性が高い。VSV-SARS-St19 の培養細胞への感染は、SARS-CoV を免疫したウサギ血清で中和されたが、コントロールとして用いたウサギ血清では中和されなかった。VSV-SARS-St19 シュードタイプの感染の有無は green fluorescence protein(GFP) の発光を指標に、感染後7時間で定量的に判定可能であった。これらの結果から、VSV-SARS-St19 はウイルス中和試験に有用であると考えられた。

A. 研究目的

これまでの研究により、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が明らかになっている。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、検体の種類や、検体採取の時期により、検出率が大きく左右される。

SARS の血清診断にはウイルス中和抗体、間接蛍光抗体法、ELISA 法が行われるが、いずれの結果も良く一致する。ウイルス中和試験は感度、特異性ともに優れていて、SARS 診断のゴールドスタンダードである。しかし、ウイルス中和試験には SARS-CoV そのものを用いるため、封じ込めができる安全な検査設備(P3)が必要であり、しかも作業が繁雑で判定まで

の2-3日を要する。また、SARS アウトブレイク終息後、シンガポールと中国(北京)で相次いで実験室感染事故が起きたことから、SARS-CoV そのものを用いずに行える実験室診断体制を確立することが求められている。従って、本研究では1)安全な中和抗体測定に用いるための非増殖性ウイルス(シュードタイプウイルス)の作製、および2)それを利用した迅速中和抗体測定系の確立を目的としている。

B. 研究方法

1) SARS-CoV-S 蛋白質遺伝子のクローニング

SARS-CoV HKU39849 株を感染させた Vero E6 細胞から、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 蛋白質遺伝子 cDNA を増幅してプラスミド pKS336 にクローニングした (pKS-S)。SARS-CoV-S 蛋白質のうち、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)。さらにネガティブコントロール plasmid として用いるために pKS-St19 とは逆向きの方向にインサート cDNA を挿入した plasmid pKS-St19rev を作製した。

2) SARS-CoV-S 蛋白質の発現

上記の S 蛋白質発現用 plasmid を 293T 細胞にトランスフェクトし、48 時間後、ウサギ抗 SARS-CoV 血清をもちいて SARS-CoV-S 蛋白質の発現を間接蛍光抗体法で検出した。

3) VSV シュードタイプの作製

S 蛋白質発現 plasmid をトランスフェクションした 293T 細胞に 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 遺伝子を組み込んだ) を感染させ、24 時間後、培養上清 (SARS コロナウイルスの 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。作製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評価した。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 でカウントした。

C. 結果

1) SARS-CoV-S 蛋白質の発現

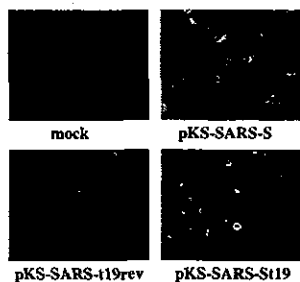
pKS-S および pKS-St19 (SARS-CoV-S 遺伝子全長の cDNA および SARS-CoV-S 蛋白質のうち、C 末端側の細胞質ドメイン 19 アミノ酸を欠損させた S 遺伝子 cDNA を pKS336 にクローニングしたものを) を 293T 細胞へトランスフェクション後、SARS-CoV に対するウサギ血清を用いた蛍光抗体法で S 蛋白質の発現を確認した (図

1)。いずれの場合も細胞表面に強い蛍光シグナルがみられた。ネガティブコントロールとしてもちいた pKS3-St19rev をトランスフェクションした場合には蛍光シグナルが認められなかった。

2) VSV シュードタイプウイルスの作製

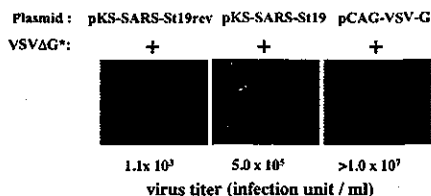
水泡性口内炎ウイルス (VSV) シュードタイプウイルスは、本来の VSV 膜タンパク質をコードする G 遺伝子を欠いていて、膜タンパク質が供給されない限り abortive infection なので、生物学的封じ込めの観点からも安全性が高い。また、GFP の発現を指標に短時間でシュードタイプウイルスの感染を定量的に測定することができる。そこで、SARS-CoV-S 蛋白質を被った VSV シュードタイプの作製を行った。上記の SARS-CoV-S 蛋白質発現 293T 細胞に VSVΔG*-G ウイルスを感染させ、24 時間後、培養上清中の SARS-CoV-S 蛋白質を被った VSV シュードタイプを回収した。このウイルスを SARS-CoV 感受性細胞である Vero E6 に感染させ、GFP の発現を蛍光顕微鏡下で観察した (図 2)。インタクトな S 蛋白質を発現させた 293T 細胞から回収した培養上清を Vero E6 に加えても GFP の発現が認められなかった。このことから、インタクトな S 蛋白質を発現させた場合は VSV 粒子に取り込まれにくく、シュードタイプウイルスの作製は困難であると考えられた。一方、C 末端側の細胞質ドメイン 19 アミノ酸を削った S 蛋白質を発現させた細胞から回収した培養上清を Vero E6 に加えた場合は多くの GFP 陽性細胞が認められた (図 2)。これらの結果から、C 末端側の細胞質ドメインを欠失させると S 蛋白質は VSV 粒子に効率よく取り込まれると考えられた。このように作製したウイルスを「SARS-CoV-S 蛋白質を被った VSV シュードタイプ (VSV-SARS-St19)」とし、以後の検討に用いた。

図 1



Expression of SARS-CoV-S protein. 293T cells were transfected with the indicated expression plasmid or were mock transfected as controls. After 24 h, SARS-CoV-S or SARS-CoV-St19 protein was detected by immunostaining with rabbit anti-SARS-CoV, followed by FITC-conjugated anti-rabbit IgG.

図 2

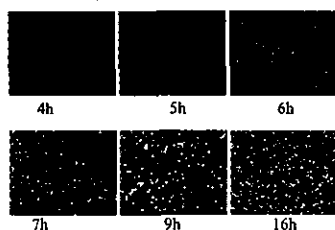


Infection of Vero E6 cells by VSV pseudotypes. VSVΔG* was inoculated onto 293T cells transfected with the indicated expression plasmid. After 24 h, culture supernatants were collected, and then inoculated onto Vero E6 cell monolayers. GFP expression was examined by fluorescence microscopy.

3. VSV-SARS-St19 感染の検出法

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 (図 3)。

図 3



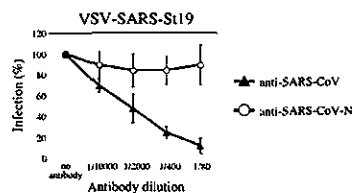
Rapid detection and quantification of VSV-SARS-S infection. Vero E6 cells were infected with VSV-SARS-St19 and GFP expression was examined at the indicated time points after infection under fluorescence microscopy.

4. VSV-SARS-St19 感染の特異性

次に、VSV-SARS-St19 感染の特異性の検討を行った。段階希釈したウサギ抗 SARS-CoV 血清 (anti-SARS-CoV) と VSV-SARS-

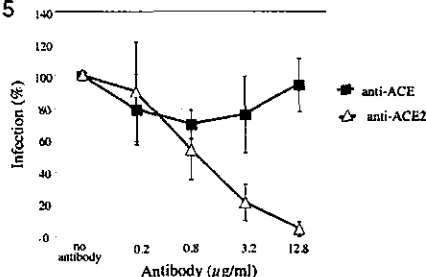
St19 を予め mix した後、Vero E6 細胞へ接種し、VSV-SARS-St19 の感染が中和されるかどうか調べた (図 4)。その結果、VSV-SARS-St19 の感染は anti-SARS-CoV によって中和されることが明らかになった。コントロールとして用いたウサギ血清 (anti-SARS-CoV-N) では中和されなかった。これらの結果から、VSV-SARS-St19 は SARS-CoV-S 蛋白質を介して細胞に感染することが明らかになった。また、SARS-CoV のレセプターであるアンジオテンシン I 変換酵素 2 (ACE2) に対する抗体 (anti-ACE2) で予め Vero E6 を処理すると VSV-SARS-St19 の感染は阻害されたことから、VSV-SARS-St19 の感染は細胞表面のレセプターである ACE2 依存的であるか明らかになった (図 5)。

図 4



Specificity of infection of VSV-SARS-St19 pseudotype. VSV-SARS-St19 pseudotype was pre-incubated with serially diluted anti-SARS-CoV or anti-SARS-CoV-N followed by inoculation onto Vero E6 cells. At 7 hpi, GFP-positive cells were counted. The number of GFP-positive cells in the absence of antibodies was set as 100%. The results shown are from three independent assays, with error bars representing SD.

図 5



ACE2-dependent VSV-SARS-St19 pseudotype infection. Vero E6 cells were pre-incubated with serially diluted anti-ACE or anti-ACE2 polyclonal antibody, and then infected with VSV-SARS-St19 pseudotype.

D. 結論

- 1) SARS-CoV-S蛋白質を被ったVSVシュードタイプの作製に成功した。
- 2) VSV-SARS-Sシュードタイプの感染の有無

はGFPの発光を指標に、感染後7時間で定量的に判定可能であった。

- 3) VSV-SARS-SシールドタイプのVero E6への感染は、SARS-CoV-S蛋白質と細胞表面のレセプターであるACE2に依存的であった。

E. 考察

従来のSARS-CoV中和抗体測定法はSARS-CoVそのものを用いるため、P3レベルの封じ込め施設が必要である。今回作製したSARS-CoVのS蛋白質を被ったシールドタイプウイルスVSV-SARS-St19は非増殖性のウイルスであり安全性が高く、高度な安全施設は不要である。ウサギ抗SARS-CoV血清や抗ACE2抗体を用いて感染の特異性を検討したところ、VSV-SARS-St19のVero E6への感染はSARS-CoV-S蛋白質および細胞表面レセプター分子であるACE2に依存的であることが明らかになった。さらに、VSV-SARS-St19の感染は7時間で定量的に判定可能であることから、迅速診断法として有用であると考えられた。今後、ヒト血清を用いた中和抗体の測定を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizutani 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) 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.

2. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特許取得: 該当なし

3. 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 expressin mouse ACE2. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸

4. 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
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

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：重症急性呼吸器症候群ウイルス（SARS-CoV）のレセプターである 2 型アンギオテンシン転換酵素（ACE2）を表面に被ったシュードタイプバキュロウイルスは、SARS-CoV のスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ特異的に感染し、遺伝子を導入できた。

A. 研究目的

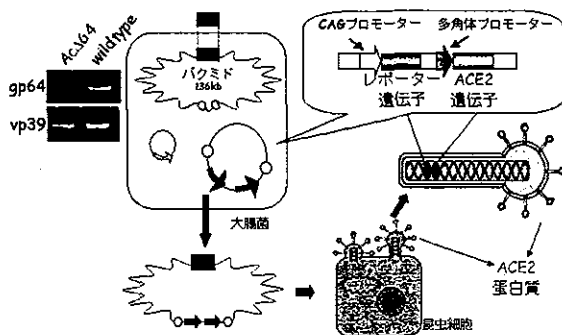
SARS-CoV の中和抗体を安全に測定するため、SARS-CoV のスパイク蛋白質を被ったシュードタイプウイルスがレトロウイルスや水泡性口内炎ウイルスで開発されている。本研究は、SARS-CoV の受容体である ACE2 を被ったシュードタイプバキュロウイルスを作製し、安全で迅速な SARS-CoV の中和抗体測定系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

まず、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作製し、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作製した (Fig. 1)。

この組換えゲノムを昆虫細胞に導入して培養

Fig.1 ACE2シュードタイプウイルスの作製法

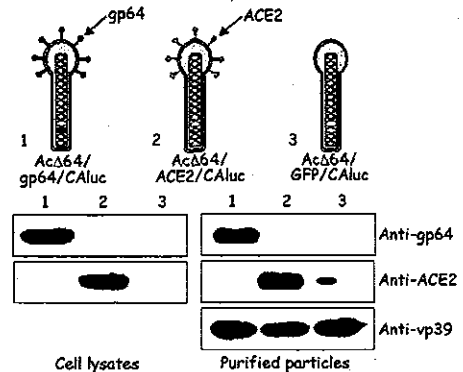


上清中からシュードタイプウイルスを回収し、濃縮・精製した。ウェスタンブロットによって

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。

C. 研究結果

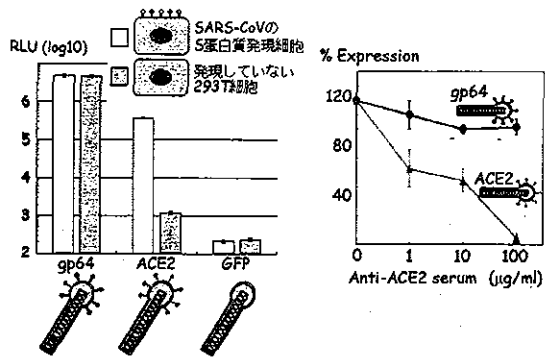
Fig.2 ACE2シュードタイプウイルスの性状



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 シュードタイプウイルスからは、ACE2 が検出され、ACE2 が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 (Fig. 2)。

この ACE2 シュードタイプ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 のスパイク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。さらに、抗 ACE2 抗体による中和試験を行った結果、特異的な中和が認められた (Fig. 3)。

Fig.3 ACE2シュードタイプウイルスの感染指向性



ロウイルスを用いたターゲティングベクターの開発、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

阿部隆之、森石恒司、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

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

D. 考察

ACE2 を被ったシュードタイプバキュロウイルスは SARS-CoV のスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ特異的に感染できることが示された。このシュードタイプウイルスは、迅速かつ安全な中和抗体検出系への応用だけでなく、SARS-CoV 感染細胞にのみ遺伝子を導入することのできるターゲティングベクターへの応用も可能であると考えられる。

E. 結論

1. ACE2 を被ったシュードタイプバキュロウイルスを作製した。
2. 抗 ACE2 抗体によりシュードタイプウイルスは特異的に中和された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

2. 学会発表

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、松永朋子、田鍛修平、森石恒司、松浦善治：バキュ

5. SARS 迅速診断キット開発のための基礎的研究

分担研究者： 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所感染症部長
研究協力者： 加瀬哲男 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課
岡田全司 国立療養所近畿中央病院臨床研究センター

研究要旨：SARS に対する迅速診断キットを開発するため、イムノクロマト法に用いる抗体の作製を行った。SARS コロナウイルスの構造蛋白質（S、E、M、N）を解析し、5 種類のペプチドを合成した。これらをウサギに免疫し、抗ペプチド抗体を得た。すべて ELISA では反応したが、中和活性は認めなかった。染色試験で、E 蛋白のペプチドに対する抗体だけが感染細胞を染色した。

A. 研究目的

SARS の初期症状はインフルエンザなどの他の呼吸器感染症と類似しており、患者が初めて受診する医療機関での鑑別診断が感染拡大を阻止するためには極めて重要である。多くの患者を診察する医療現場では迅速且つ簡便な検査法が必要とされ、インフルエンザや RS ウイルス感染症などの呼吸器感染症を診断するため、最近ではイムノクロマト法が繁用されるようになってきた。10～15 分で結果が判明するこの方法は、SARS を迅速診断するのにも有用と考えられ、実用化を目指す最初のステップとして SARS コロナウイルスに対する抗体の作製と、その性状解析を行った。

B. 研究方法

ウイルスと細胞：2 種類の SARS コロナウイルス、HKU39849 株（Peiris 教授より分与）と FFM-1 株を実験に用いた。ストックウイルスの作製、感染価測定、中和試験、染色試験のため Vero E6 細胞を用いた。

ペプチド抗原性サーチ：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た。最終的に以下に示す合計 5 種類

のペプチドを合成した。

TW1 S 431-447；

Cys + TSTGNYNKYRYLRHGK

TW1 S 1129-1145；

Cys + SFKEELDKYFKNHTSPD

TW1 E 59-71；

YSRVKNLNSSEGV + Cys

TW1 M 102-116；

Cys + FARTRSMWSFNPETN

TW1 N 30-45；

NGGRNGARPKQRRPQG + Cys

ウサギを用いた抗ペプチド抗体の作製：

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。

中和試験：ウサギ血清を 56℃で 30 分間、非動化した。2 倍階段希釈した血清と 100TCID₅₀ のウイルス液を 1:1 で混合し、37℃で 30 分間中和させた。残存ウイルス液を 96 穴マイクロプレート内の VeroE6 細胞に感染させ、48 時間培養した。培養後、細胞をホルマリンで固定し、アミドブラック 10B で染色した。

染色試験：96 穴マイクロプレート内の VeroE6 細胞に 100TCID₅₀ のウイルスを感染させ、24 時間後にエタノールで 30 分間固定した。さらに UV 不活化も行って、安全を期した。次いで、ウサギ血清を一次血清（250 倍希釈）として PAP 法で染色し、感染細胞内のウイルス抗原と

の反応性を調べた。

C. 研究結果

(1) 抗ペプチド抗体の ELISA 価

最初の免疫から 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。すべての血清は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 (図 1)。

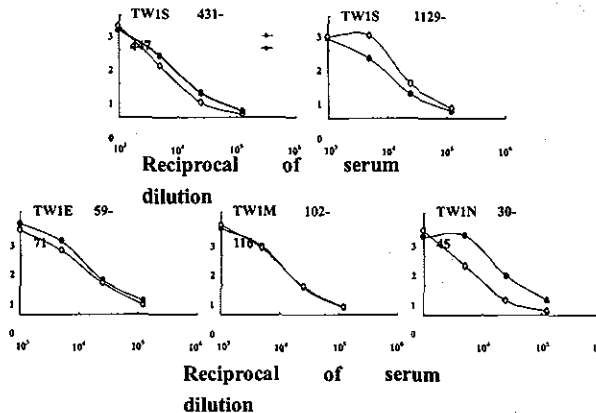


図 1. ウサギ抗ペプチド抗体の ELISA 価

(2) 抗ペプチド抗体の中和活性と染色活性

ELISA で調べた抗ペプチド抗体の中和活性と染色活性を測定した。抗体はすべて中和活性を認めなかったが、染色試験により E 蛋白の抗ペプチド抗体がウイルス感染細胞と反応した (表 1)。

表 1. 抗ペプチド抗体の中和活性と染色活性

抗ペプチド抗体	中和活性		染色活性	
	HKU39849	FFM-1	HKU39849	FFM-1
TWIS 431-447	-	-	-	-
TWIS 1129-1145	-	-	-	-
TWIE 59-71	-	-	+	+
TWIM 102-116	-	-	-	-
TWIN 30-45	-	-	-	-

D. 考察

呼吸器症状や胃腸症状を示す感染症は多くの病原体が関与しており、診療現場で正確な診断を下すことは極めて困難である。患者の中には急速に症状が悪化する例もあり、短時間に確定診断を求められることも少なくない。この要求に応えられる検査法として、イムノクロマト法が開発され、最

近ではインフルエンザウイルス、RS ウイルス、ロタウイルスの診断に日常的に用いられている。特に SARS は迅速な診断が要求される感染症で、イムノクロマト法の実用化が望まれる。

イムノクロマト法の感度、特異性を左右するのは抗体の性質で、SARS コロナウイルスの構造蛋白に対する抗体を多数作製して調べる必要がある。一般にモノクローナル抗体が使用される場合が多いが、ポリクローナル抗体が優れている場合もあり、今回はウサギにペプチドを免疫して抗ペプチド抗体を得た。これら抗体は ELISA で免疫原性を有することが証明された。しかし、すべての抗体は中和活性を有さず、染色試験で E 蛋白のペプチドに対する抗体だけが感染細胞と反応した。この抗 E ペプチド抗体は感染細胞内の E 蛋白と反応したと考えられるが、感染によって細胞内に誘導された別の蛋白と反応した可能性もあり、今後の検討が必要である。

現在、SARS コロナウイルスに対するヒトやマウスのモノクローナル抗体を作製している。今後は得られた抗体の性状を解析し、最適な抗体を選択してイムノクロマト法の実用化を進めたい。

E. 結論

SARS コロナウイルスのペプチドを免疫して得られたウサギの抗ペプチド抗体は、ELISA で免疫原性を有することが認められた。これら抗体は中和活性を示さなかったが、E 蛋白のペプチドに対する抗体だけが感染細胞を染色した。

F. 研究発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Maeda, A., and Okuno, Y. Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season. J. Clin. Microbiol.42:3295-3297. 2004.
2. Okamoto, S., Kawabata, S., Fujitaka, H., Uehira, T., Okuno, Y., Hamada, S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. Vaccine 22:2887-2893. 2004.

3. Kumagai, T., Nagai, K., Okui, T., Tsutsumi, H., Nagata, N., Yano, S., Nakayama, T., Okuno, Y., Kamiya, H. Poor immune responses to influenza vaccination in infants. *Vaccine* 22:3404-3410. 2004.
4. Okamoto, S., Kawabata, S., Terao, Y., Fujitaka, H., Okuno, Y., Hamada, S. The *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacteria-viral superinfection. *Infect. Immun.* 72:6068-6075. 2004.
5. 奥野良信：インフルエンザの疫学、サーベイランス（国内）。最新医学、59：42-47、2004
6. 奥野良信：ワクチン学入門—予防接種で免疫ができるまで—。小児内科、377-381、2004
7. 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
8. 奥野良信：インフルエンザの脅威。臨床病理レビュー特集号 129：93-101、2004
9. 奥野良信：インフルエンザ生ワクチン。総合臨床、53(6)：1866-1870、2004
10. 奥野良信：海外で必要なワクチン—その他の海外で必要なワクチン—。小児科診療、67 (11)：1961-1965、2004
11. 奥野良信：世界のインフルエンザ—何が変わってきたのか。総合臨床、54(2)：234-238、2005

6. SARS/RT-LAMP検出試薬開発と臨床評価

国立感染症研究所ウイルス第3部

部長 田代真人

感度と特異性が高く、高額機器や特殊技術が不要で、短時間で簡便に、SARSコロナウイルス感染を診断できる安価な診断キットの開発・実用化を行った。栄研化学が基礎技術を開発したLAMP法を、SARSコロナウイルスの遺伝子検出に応用し、基礎実験、臨床検体を用いた性能試験を行った。初期のSARS患者の血清・血漿を検体として、65度の恒温槽を用い、30分程度で、簡便に検査と判定ができ、現行RT-PCRに優る感度と特異性を持つことが示された。

〔研究の背景〕

2003年11月以来半年にわたって世界を震撼させたSARSは現時点では患者発生は報告されていない。しかし、SARSコロナウイルスの起源は依然不明であり、夏期には消えているが毎年冬になると出現を繰り返すヒトコロナウイルスの性状などから類推して、冬期にSARSの再出現が危惧されている。社会への蔓延を未然に防ぐためには、SARS患者ないしはウイルス感染者およびその可能性があるものについては、速やかに入院隔離、停留等の措置、行動制限の指示などの行政対応が必要となる。そのためには、検疫所、医療現場、保健所などの第一線において、これらの患者、感染者の早期発見、検知、確認が必須となる。

一方、冬季にはインフルエンザが流行し、多数の重症例を含む数百万人レベルの発熱・呼吸器症状を呈する患者が発生するが、SARSの初期症状はインフルエンザと区別が付かないために、SARS感染患者とインフルエンザ患者の臨床的な鑑別

は困難である。

現在のところ、インフルエンザに対する迅速診断キットは普及しているが、その感度、特異性には問題も多く、更にインフルエンザと診断されてもSARSを否定できない。一方、SARSの初期患者に対するウイルス学的診断としては、ウイルス遺伝子を増幅して検出するRT-PCRおよびそれを自動化・定量化したreal-time PCRが用いられているが、何れも感度は20～50%程度で、SARSの確定診断あるいは否定には信頼にたらない。更に、検査結果が出るまでに、RT-PCRでは半日以上も掛かり、後者では2時間以内に結果は出るものの、1千万円前後の高額な特殊機器を必要とする。

このような状況から、SARS再出現の有無に関わらず、多数のインフルエンザ様患者についてSARSを否定することは困難な状況であり、第1線の現場では大きな混乱が生じることが懸念されている。

そこで、第1線の現場において、初期のSARS感染患者について、高い感度と特異性を持って診断でき

る診断方法の確立が緊急課題となっている。さらに、現場において、短時間で、高額な特殊機器や訓練を必要とせず、簡単に実施しうる利便性が高く、また低価格で途上国でも十分に使用しうる、迅速簡易診断キットの開発がWHOをはじめ世界各国の厚生行政当局からも強く望まれている。

[研究目的]

このような世界のニーズに応ずるために、総合科学技術会議の指定によるSARS緊急研究の1テーマ『SARSの簡易迅速診断法の開発』の指定を受けて、上記の条件を満たすSARS迅速簡易診断キットの開発・実用化を目標として研究を進めた。

[研究方法]

全く新規の原理に基づいた診断キットの開発は時間的に不可能であったので、それまでに報告されていた各種の迅速診断法を検索し、また幾つかの提案とともに、その有用性、実現性などを検討した。その中で、栄研化学(株)が独自に基本技術を開発し、既に幾つかの病原体の診断方法として実用化されて高い評価を得ている新規遺伝子増幅法(LAMP法)に基づいたSARSコロナウイルス遺伝子検出法が最も有力な候補と考えられた。この方法は、5月の時点で、最も基礎研究段階が進んでおり、検出方法も高価な装置や特別の技術を必要とせず、15～20分程度という短時間で結果が得られ、目視による判定も可能であり、感度と特異性が十分に高いことが予想され、しかも低価格な簡易迅速診断法であることが期待された。しかも、開発が成

功した際には、キット化して大量に製造・供給することも期待できることから、今後の開発研究の進展が期待される候補として、高い優先度をもつと判断された。これに関して、合同研究班会議で取り上げ検討された結果、栄研化学との共同開発チームを構成して、効率よく簡易迅速診断キットの開発を進めることとなった。

本キットの開発共同プロジェクトにおいては、キット本体の設計、試験製造、ウイルスRNA標準品を用いた性能試験は栄研化学が担当し、国立感染症研究所の役割は、客観的な観点から、臨床検体を用いて、従来のRT-PCR法との感度を比較評価することである。

臨床評価に際して、国内ではSARS患者検体が得られないことから、WHOのSARS研究ネットワークを通じて東南アジアなどSARS流行地域の関連研究機関に協力を求め、海外の研究機関および国立感染症研において性能試験を実施した。限られた臨床検体の共有と有効な使用に関するネットワーク内の協議が、様々な利害が絡んで困難な状況にあったが、6月にバンコクで開催されたAPEC会議における厚生労働大臣による5カ国との二者会談における協力要請によって、検体の提供および共同研究が可能となった。これに基づいて、7月には香港、シンガポール、ベトナム、台湾等と厚生労働省との間での実務者会談が行われ、LAMP法によるSARS遺伝子診断キットの臨床試験に関する国際協力体制が整った。このような国際協力体制の下で、当該国を中心とする研究機関の協力により臨床評価を進め、その結果を国立感染症研究所(合同研究班分担

研究者)が中心となりまとめ上げた。

[治験試薬および対照試薬]

1. 験試薬：SARS/RT-LAMP検出試薬
2. 照試薬：
国立感染症研究所ウイルス第3部
自製RT-PCR試薬
香港中文大学医学部
自製RT-PCR試薬
香港特別行政区衛生部ウイルス部門
自製RT-PCR試薬

[患者検体およびパネル検体]

検体の種類は、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、糞便などである。

[測定施設]

1. 立感染症研究所
WHOパネル検体、ベトナムから送られたSARS感染患者との接触者の血清(血漿)各種検体
2. 港中文大学
血清(血漿)、咽頭・鼻腔拭い液、糞便
3. 港特別行政区政府衛生署
血清

[測定結果]

1. 立感染症研究所
(1)WHOパネル検体サーベイランス(表1)
(2)SARS感染患者との接触者検体(表2、表3)

2. 港中文大学(表5)
3. 港特別行政区政府衛生署(表6)

[結果および考察]

1. 対立感染症研究所
(1) WHO SARS診断施設を対象としたSARS診断感度に関するパネル検体による性能試験
平成15年6月にドイツ・ベルリンのロベルト・コッホ研究所が中心となり、WHOのSARSコロナウイルス遺伝子RNAのパネル標品を各検査施設に配布した。各施設では、各々で行っている方法を用いた測定を行い、その結果をベルリンに報告した。今回その結果が集計されて評価され、中間報告が平成15年11月にジュネーブで開催されたWHO SARS研究検査ネットワーク会議で発表された。但し個別の結果報告は行われていない。「感染症研究所のRT-PCRは明らかに感度不足であるが、LAMP法は素晴らしく優秀な結果である」とのLAMP法に対する高い評価を示すコメントが届いた。
(2) SARS感染患者との接触者検体
感染研で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。まず無症状の患者接触者の検体からこれだけ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。従って本検査においては、血清検体が貴重なため、一テスト

当り5 μ Lの血清を使用せざるを得なかった。そのため検体量を増した場合には検出率が高くなった(表4)。実際の試験では、2~3mL以上の採血は可能であるので、LAMP法の感度は今回の成績の25倍程度であると判断される。

2.

港中文大学

香港中文大学のRT-PCR法においては、検体からウイルスRNAを抽出する際に、感度を上げる目的で、カラムに5回通して約10倍に濃縮した上でnested RT-PCRを行っており、測定所要時間が7時間以上と臨床現場では実際的なものでない。LAMP法との比較においては、陽性率はほぼ同程度であるが、操作性の違いを考慮すると、利便性においてはLAMP法の優位は問題にならない。

3.

港特別行政区政府衛生署

全ての検体は抗体陽性となった患者由来のものであり、発症後頓日的に揃ったパネル検体である。自家RT-PCR用いて測定した際には、検体は採取直後で非凍結状態のまま試験に供しているが、今回のLAMP法を実施した際には、一旦凍結保存されていたものを融解して用いている。検体量が少ないため、他の試験については同時に行われていない。この様な保存状況においても、LAMP法は自家RT-PCRと同等の成績であった。

発症後早い時期には、検体中のウイルスRNAのコピー数は検出感度限界付近と極端に少ないため、陰性となることは仕方ない。SARS患者においては、そもそも病初期においてはウイルス遺伝子が上気道粘膜には存在しな

いと考えられている。一方、早い時期からウイルス血漿となることから、血液を検体とした方が再現性のある結果が得られている。しかし、血中の濃度も検出限界に近いと、同じ検体を分けて検査を行っても、全ての検査が陽性とはならないことは理にかなっている。

それよりも2週目に入って陰性結果が多いのが懸念されると責任者のWilina Lim博士が指摘している。

[結論]

SARS/RT-LAMP 検出試薬は国立感染症研究所が現在行っているRT-PCRよりも感度が高いが、香港特別行政区政府衛生署の自家製RT-PCRまた香港中文大学の自家製nested RT-PCRとはほぼ同等であった。

また発症初期の血清では陰性の割合が高いが、今回は5 μ Lという微量の血清検体を用いたために感度が低くなっていると考えられる。実際に患者が出た場合の現場では、十分量の血液を採血出来るので、血清200 μ Lを使用することが可能である。従って、現場でLAMP法のキットを使用する際の検出感度は、今回の成績よりも5~40倍程度高くなるものと考えられる。

現行のRT-PCR法においては、感度の問題もさることながら、実験室内の交叉汚染による擬陽性例が多い。WHOでは当初、なるべく感度を上げて、偽陽性も含めて検出し、見逃しを無くすることを目標にしていた。しかし、SARSが流行していないインフルエンザの流行期においては、これらの偽陽性例が全て報告されると、現場はいちいち対応せねばならず、その影響は大きな問題となっている。そのため、最近WHOでは、高感度よりはむしろ偽陽性を出さないために特異性を

高めて精度を向上させることを強く要請している。この点については RT-LAMP の増幅原理からも理解できるように特異性が圧倒的に高く、これは他施設での各種コロナウイルスとの交差反応が全くないこと、及びこの度の陰性の臨床検体の成績からも実証されている。

臨床材料を用いた性能試験においては、系統的なパネル検体が存在せず、貴重な検体のごく一部分のみを使用せざるを得ない状況であり、今回の検体数以上の検体を用いた試験の実施は実際上不可能に近い。限られた成績ではあるが、LAMP法はSARSの初期診断には、十分に使用可能であると判断される。

また本キットは、高価な特殊装置および特別の技術を必要とせず、15～30分程度という短時間で結果が得られ、目視による判定も可能であり、特異性が十分に高いこと、また感度も現在使用されている既存の方法と同等以上であり、しかも低価格な簡易迅速診断法であることと結論できる。

[発表論文]

1. B. L. Haagmans, T. Kuiken, B.E. Martina, 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
Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques.
Nature Med. 10: 1-4, 2004
2. 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. 50:1050-1052, 2004
3. Takasuka,N., Fujii,H., Takahashi,Y., Kasai, M., Morikawa,S., Itamura,S., Ishii,K., Sakaguchi,M., Ohnishi,K., Ohshima,M., Hashimoto,S., 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. 16:1423-1439, 2004
4. Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Notomi, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Matsuyama, S., Long, H.-T., Hanh, G. T.-H., 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)
5. Okada, M., Takemoto, Y, Okuno, Y., Hashimoto, S., Yoshika, S., Fukunaga, Y., Tanaka, T., Kita, Y., Kuwayama S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Takai, H., Okada, C., Sakaguchi, Y., Furukawa, I., Yamada, K., Matsumoto, K., Kase, T., de Mello, D. E., Peiris, J.S.M., Chen, P.-J., Yamamoto, N.,Yoshinaka, Y., Nomura, T., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., Sakatani, M.
The development of vaccines against SARS coronavirus in mice and SCID-PBL/hu mice.
Vaccine (in press)
6. Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Kagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsubetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Marikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H., Takemori, T.
Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies.
Jpn. J. Infect. Dis. (in press)

表 1 WHOパネル検体サバーランス

パネル番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LAMP キット	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	(2/2)	(2/2)	(0/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(0/2)	(0/2)	(2/2)	(2/2)
	⑥	①		④	⑦	③			②	③
RT-PCR	-	+++	-	++	+	+	-	+	+	-

本キットの下端：(陽性数/陰性数)

①～⑦はコピー数の多い順序を示す。

表 2-1 国立感染症研究所におけるベトナム患者との接触者検体での測定結果 - 検体数での集計 -

Specimen type	Number of sample	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
serum	279	30	249	30	231	1	65

表 2-2 国立感染症研究所におけるベトナム患者との接触者検体での測定結果 - 接触者数での集計 -

Specimen type	Number of patient	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
serum	141	15	126	16	114	1 (2)	43 (42)

表 3 国立感染症研究所におけるモンゴル、香港及び台湾患者検体の測定結果

Nationality	Specimen type	Number of patient	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
			Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Mongolia	serum	22	2	20			2	20
Hong Kong	serum	7	4	3			2	5
Chinese Taipei	serum	20	3	17			3	17
Total		49	9	40			7	42

表4 香港中文大学における測定結果

Diagnosis	Specimen Type	n	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
			Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	DEEP NASAL SWAB	6	4	2	4	2	5	1
	NASAL SWAB	7	4	3	3	4	3	4
	NASAL SWAB RESP	1	0	1	1	0	0	1
	RECTAL SWAB	10	8	2	6	4	7	3
	STOOL	68	56	12	55	13	60	8
	STOOL(RECTAL SWAB)	1	0	1	0	1	0	1
	RESP THROAT GARGLE	1	0	1	0	1	1	0
	THROAT GARGLE	11	5	6	2	9	10	1
	THROAT SWAB	3	1	2	2	1	3	0
SPUTUM	1	1	0	1	0	1	0	
Total %		109	79 72.4	30 27.5	74 67.9	35 32.1	90 82.6	19 17.4
Negative	NASOPHARYNGEAL ASPIRATE	2	0	2	0	2	0	2
	STOOL	5	0	5	0	5	0	5
	THROAT NASAL SWAB	2	0	2	0	2	0	2
	TRACHEAL ASPIRATE	1	0	1	0	1	0	1
Total %		10	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0
Unknown (Positive Patient)	PLASMA	10	1	9	0	10	0	10
Total %		10	1 10.0	9 90.0	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0
Unknown (Expected Negative)	PLASMA	10	0	10	0	10	0	10
Total %		10	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0
Unknown (real time PCR positive in same day blood specimen)	PLASMA	10	2	8	1	9	3	7
	SERUM	11	2	9	1	9	5	6
Total %		21	4 19.0	17 81.0	2 10.0	19 90.0	8 38.1	13 61.9

表 5 香港特別行政区政府衛生署における測定結果

Diagnosis	Specimen Type	Day-onset	n	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence	
				Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	serum	0	1	0	1	0	1
		1	4	0	4	0	4
		2	4	1	3	1	3
		3	8	1	7	1	7
		4	2	0	2	0	2
		5	6	1	5	1	5
		6	2	0	2	0	2
		7	9	5	4	1	2
		8	7	2	5		
		9	4	0	4		
		10	3	1	2		
		Total	50	11	39	4	26
Negative	serum		30	0	30		

表 6 総計

diagnosis	specimen type	institution	nationality	n	RT-LAMP turbidity		RT-LAMP visual fluorescence		RT-PCR	
					+	-	+	-	+	-
positive	serum/plasma	国立感染研	Mongolian							
		香港衛生署	Chinese							
		中文大学	Taiwan	50	11	39	4	26		
	nasal swab	中文大学	Chinese	14	8	6	8	6	8	6
	throat swab	中文大学	Chinese	16	7	9	5	11	15	1
	stool 他	中文大学	Chinese	79	64	15	61	18	67	12
小計				159	90	69	78	61	90	19
positive (不顕性)	serum	国立感染研	Vietnam	141	15	126	16	114	1	43
unknown (positive)	serum/plasma	中文大学	Chinese	31	5	26	2	29	9	22
合計				331	108	223	96	204	100	84
negative	serum	香港衛生署	Chinese	30	0	30	0	30		
	others	中文大学	Chinese	10	0	10	0	10	0	10
小計				40	0	40	0	40	0	10
unknown (negative)	plasma	中文大学	Chinese	10	0	10	0	10	0	10
合計				50	0	50	0	50	0	20

7. 「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」

分担研究報告書

「LAMP 法による SARS 診断法の改良」

分担研究者 納富 継宣 栄研化学株式会社 生物化学研究所 第二部長

研究要旨 LAMP 法を用いた高感度なゲノム検出系の開発を目指し、下記の 3 点について検討を行った。

1. 現行開発済みとは 3 つの別領域でプライマー設計を行い、増幅を確認した。今後感度、特異性を中心に検討する予定である。2. 検出感度に直結する増幅初期反応の改善を目指し逆転写酵素のスクリーニングを行い、現行と同等以上の感度を示した酵素を 7 種見出した。さらに阻害物質の影響を中心に検討し、候補を絞っていく予定である。3. 抽出 RNA の全量を反応に持ち込める高感度な新規な抽出方法を開発した。今後迅速化、および操作の簡便化を検討予定である。

分担研究者 納富 継宣

栄研化学株式会社生物化学研究所
第二部長

A. 研究目的

LAMP 法による SARS-CoV 遺伝子検出法の改良を行い、測定感度向上、測定効率改善および操作性の改善を行うことを目的とする。これらの成果は、SARS が臨床上疑われた場合、より迅速、正確に診断を可能にすることにより、患者の隔離、二次感染防止対策をより有効に行うことを可能にする。

B. 研究方法

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良

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た。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った。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素の再スクリーニング

逆転写工程を改善するために、まず逆転写酵素を広くスクリーニングすることから研究を開始し、現在までに 21 種類の酵素についてスクリーニングを実施した。

3. 新規ウイルス RNA 抽出方法の検討

現在、ウイルスの抽出には QIAGEN 社の RNA 抽出キットを用いているが、抽出 RNA の 10 分の 1 しか増幅反応へ持ち込めない。もし、全量を反応に持ち込むことが可能になれば、検体の検出感度は 1 桁上昇することになる。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。

C. 研究結果

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良

現在までに塩基配列番号 9000、14000、28000 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 28000 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。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素の再スクリーニング

21 種の酵素のうち、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。

3. 新規ウイルス RNA 抽出方法の検討

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