

200400599A

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ペプチド抗体によるSARS（重症急性呼吸器症候群）診断の迅速化  
に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 伊東 恭悟

平成17年（2005）年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

ペプチド抗体によるSARS（重症急性呼吸器症候群）

診断の迅速化に関する研究 ..... 1-6

伊東恭悟

## II. 分担研究報告

1. ウイルスゲノム解析による抗体測定用ペプチドの選択

および感染患者血清の入手に関する研究 ..... 7-10

笹月健彦

2. フローメトリーによる抗ペプチド抗体の測定に関する研究 ..... 11-14

七條茂樹

3. SARS感染者血清の管理、SARS研究マニュアル策定

および抗体測定に関する研究 ..... 15-18

切替照雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
総括研究報告書

ペプチド抗体によるSARS(重症急性呼吸器症候群)診断の迅速化に関する研究

主任研究者 伊東 恭悟 久留米大学医学部教授

研究要旨:(目的)SARSウイルスの構造タンパク由来ペプチドの中から、患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体によって認識されるエピトープを同定し、これらを用いた迅速診断法を確立する。(結果)SARSウイルスの構造タンパク由来15残基のアミノ酸からなる5残基オーバーラップペプチド197種類を3名の急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42種類のペプチドが陽性であった。これらのペプチドのうち、健常人・非SARS感染患者血清に比べて感染6ヶ月後に採血した患者(45名)血清で認識されるペプチドを3種類(S791, M207, N161)同定した。(考察)各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。なお、本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。

■ 分担研究者

笹月 健彦 国立国際医療センター総長  
七條 茂樹 久留米大学医学部助教授  
切替 照雄 国立国際医療センター研究所部長

米大学医療センターより供与された(伊東、七條)。いずれも患者のインフォームドコンセントを得て採血した。血清は、直ちに加熱非動化処理し、高度安全管理室内の専用超低温槽に施錠して保管した(切替)。

A. 研究目的

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」は感染経路が特定されていないなど再流行の可能性は依然残ったままである。更に、昨年は鳥インフルエンザが流行し新興感染症に対する対策が急務である。これらの新興感染症は、治療法や診断法などに関して未だ不明な点が多い。そこで、SARSウイルスの構造タンパク由来ペプチドの中から、患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体によって認識されるエピトープを同定し、これらを用いた迅速診断法を確立する。

B. 研究方法

血清収集、管理

SARS感染患者血清; 感染初期に3名の台湾人より(伊東、笹月)採血した血清はJen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より供与された。50名の健常人、230人の発症しなかった医療従事者(接触非感染者)および45名のSARS感染後6ヶ月に採血した患者血清はベトナムのHanoi French HospitalおよびMai Hospitalより供与された(笹月)。健常人、インフルエンザ、HCV感染者血清、自己免疫(RA, SLE)患者血清は久留米大学病院および久留

ペプチド(伊東、笹月)

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488.2) からウイルス構成タンパク (spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)、純度70%以上で合成した。スクリーニングの結果得られたペプチドに関しては、純度90%以上で再合成し、抗体の反応性、特異性などの確認を行った。

抗体の測定(七條、切替)

各ペプチドはdimethylsulfoxide(DMSO)に10mg/mlの濃度で溶かし、-20℃で保存した。

ペプチドのcolor-coded beadsへの結合: 100μlのcolor-coded beadsを100μlのペプチド(1mg/ml in morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer, pH4.5)と混ぜ、これを1mg/mlの1-ethyl-3-[3-dimethylamino-propyl]carbodiimide-2(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (EDC)と室温暗所で30分間静置した後、Tween-20 phosphate buffered saline (T-PBS)で洗浄した。ビーズを2-aminoethanolと室温暗所で10分間処理した後、2回洗浄し、1mlの0.05% Block Ace in T-PBSに懸濁した。

**測定法:** 各種ペプチドに対する抗体は、Luminexを用いたflowmetryで行った。即ち、100から10000倍に希釈した血清(または血漿)2μlを、ペプチドを結合させたcolor-coded beads 25μl と室温、2時間96穴フィルタープレート上でインキュベートした。その後、ビーズを洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗ヒトIgGと室温で1時間反応させた。更に、洗浄後、100μl streptavidin-PEと室温で30分間反応させた後3回洗浄し、100μlのT-PBSに再懸濁した後、Luminexで測定した。

**患者血清の測定:** 実験操作は全て切替分担研究者の指導監督下、高度安全管理室(P3相当)内で行った。N95以上の性能のある感染防御マスク、使い捨てガウン、使い捨てエプロン、使い捨て手袋(2重)、汚染除去可能な履物(ゴム長靴)、ゴーグル、必要に応じて顔面カバー等を使用して実験を行った。実験使用後は、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

#### (倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り採血して研究に供している。

#### C. 研究結果

SARS-CoV感染者は、幸いにも日本では発生していないが、世界における人的交流のスピードと交流範囲の拡大を考えると、早期診断法の確立およびワクチン開発は避けて通れない。そこで、SARS-CoV感染により誘導される抗体が認識するエピトープペプチドを同定するために感染者血清を台湾(伊東、笹月)およびベトナム(笹月)より入手した。患者からのインフォームドコンセントはそれぞれの国の担当医によってなされた。

血清の管理は、切替分担研究者により適切に行われた。即ち、入手後研究に使用するまでの間、熱非動化处理後、分注して高度安全管理室(P3相当)内の鍵付き専用超低温槽に保管した。

実験操作は全て切替分担研究者の指導監督下、高度安全管理室(P3相当)内で行った。患者血清は実験使用後、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

SARSウイルスの構造タンパク由来15残基のアミノ酸からなる5残基オーバーラップペプチド197種類を3名の

急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42種類のペプチドが陽性であった。Nucleocapsid (N) が15、spike (S)が20、および membrane (M) が7種類で、envelope (E) の陽性ペプチドはなかった。以上の結果は、nucleocapsid (N) およびSpike (S) の免疫原性が強いことが示唆され、他の報告とも一致した。なかでも、spike タンパク質の791-805番目のアミノ酸からなるペプチド(S791)が最も高い測定値を示した。同様に nucleocapsid の161-175番目のアミノ酸からなるペプチド(N161)も高値を示した。

これらの42種類のペプチドのうち、健常人および接触非感染者血清に比べて感染6ヶ月後に採血した患者(45名)血清で有意(Student's t-test および Mann-Whitney test) に認識されるペプチドを3種類(S791, M207, N161) 同定した。

これら3種類のペプチドに対する抗体を健常人の測定値から求めたカットオフ値で陽性割合を算出したところ、抗S791が患者、接触非感染者、および健常人に対してそれぞれ51%、7.8%、および8%であった。同様に、抗M207に対して、それぞれ60%、4.3%、および6%で、抗N161に対して、それぞれ42%、9.1%、および4%であった。

他の感染症や自己免疫疾患における血清中抗体の交差反応性を調べる目的で日本人C型肝炎(12名)、インフルエンザ(12名)、リュウマチ(15名)、SLE(10名)、および日本人健常人(27名)で調べたところ、先の3種類のペプチドに対する交差反応は認められなかった。

抗原ペプチドに対する抗体の特異性を確認する目的で、固相化したペプチドでの吸収実験を行った。対応するペプチドで特異的に吸収され、それ以外の用いたペプチドでは吸収されなかったことから、感染者血清中で検出された3種類のペプチドに対する抗体は抗原特異的であることが示唆された。

#### D. 考察

SARSの検査法としては1) 遺伝子検査法、2) 細胞培養法、3) 抗体検査法などがあるが、いずれの方法もいまだ多くの問題点が存在している。例えば、SARS-CoV遺伝子の核酸配列や、この遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列の相同性を検索すると、bovin corona virus、poachin epidemic diarrhoea virus、murine hepatitis virus、transmissible gastroenteritis virus、avian infectious bronchitis virus、など多くのウイルスが該当する。従って、タンパク質抗原を用いたELISAで抗体を測定すると、交差反応性抗体が検出される可能性がある。各種SARS-CoV由来オーバーラップペプチドに対する抗

体を測定した場合も、ペプチドによっては健常人でも高頻度に検出される場合があった。一方、SLE患者血清でも、SARS-CoV由来のタンパク抗原を用いたELISAで測定すると交差反応が認められることが報告 (Wang et al, 2003) されている。オーバーラップペプチドに対する抗体の測定でも、SLE患者血清で交差反応するペプチドが検出され、自己抗原に対する抗体がSARS-CoV由来ペプチドと交差反応することが示唆された。これらのことから、健常人血清、各種感染症、自己免疫疾患などの患者血清中抗体が交差反応しない特定のペプチド抗原を選別し、診断用ペプチドを決定する。即ち本研究で同定した3種類のペプチドを用いた抗体の測定は特異性を確保する意味からも有用であることが示唆された。

タンパク質抗原には通常MHCクラスII分子に結合できる複数のペプチド配列が存在するため、CD4 T細胞に働くタンパク質抗原のほとんどは $T_H1$ 細胞と $T_H2$ 細胞のいずれをも誘導する。このうち、あるペプチドはMHCクラスII分子に高い親和性をもって結合し、その結果、抗原提示細胞表面に高い濃度で提示されるが、あるものは弱い親和性しか持たず、従って抗原提示細胞上には低い濃度でしか提示されない。従ってMHC分子に対して高い親和性を持つペプチドに特異的なナイーブT細胞は、高濃度のリガンドと出会うやすく、一方親和性の低いペプチドに特異的なT細胞は低濃度のリガンドにだけしか出会わないこととなり、このことはその後のT細胞の反応様式に大きな影響を与えることとなる(Constant SL and Bottomly K, Induction of  $T_H1$  and  $T_H2$  CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu. Rev. Immunol., 1997, 15: 297-322)。実際、一つの抗原内で一つのペプチドが $T_H1$ 細胞を、別のペプチドが $T_H2$ 細胞を誘導する例があることが、ある特定の抗原において実験的に示されている。このような観点から、各エピトープに対する免疫応答と個々の感染者での予後の良否、血中ウイルス量の違い、などとの関連性の今後の解析が待たれる。

本研究では、ペプチドに対する抗体の測定をLuminexを用いたflowmetry法で行った。この方法による測定では、1)微量の血清量で抗体の測定が可能、2)最大100種類の抗原に対する抗体が同時に測定できる、3)ELISAと比べて操作が簡単で、洗浄に使用する緩衝液の量も少なく済む、などの利点がある一方、4)高額の測定機器が必要、5)ELISAでの測定結果と異なる場合がある、6)同時に測定する場合の抗原の組み合わせによっては測定値が異なる場合がある、などの欠点、あるいは今後検討して明らかにすべき問題点も残されている。しかしながら、

本研究では1~3の理由から本法を選択した。本研究で同定した3種類のペプチドに対する抗体をELISA法でも測定したところ、相関性のある測定結果が得られた。

Wangら(Shi Yan Sheng Wu Xue Bao 2003, 36, 314-7)もSARS感染者血清抗体が認識する4種類のペプチドを報告しており、そのうちの一種類N66(161-175)はN161よりC-末端が7-アミノ酸残基長いペプチドで、nucleocapsidのこの部位が最も高い抗原性の一つを有することが示唆された。一方、S791は疎水性領域であるためWangらは抗体の測定を行っていない。

Nucleocapsid(N)は、抗原性が高いSARSウイルス由来のタンパク質であるが、このタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いたantigen capture ELISAをDiら(Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12, 135-40)は開発し、発症後における抗体の出現を経時的に解析した。発症後1-5、6-10、11-15、および16-20日で、陽性率はそれぞれ92.9、69.8、36.4、および21.1%と、急性期で最も高くその後次第に減少することが明らかにされた。本研究で同定された3種類のペプチドに対する抗体は、6ヵ月後でS791, M207, およびN161 に対してそれぞれ51%、60%および42%といずれも高い陽性率を示していることからペプチドに対する抗体測定の有用性が示唆された。

抗体の検出がSARS感染を診断する上でどのような意味を持つのか慎重に解析し検討する必要がある。すなわち、インフルエンザの場合は発熱して受信する頃が最もウイルス排泄が多く、クロマトチェンバーを用いたウイルス検出による迅速診断が有用であると考えられる。インフルエンザと比べて、SARSの場合は潜伏期間が通常感染後2から7日(最大10日程度)で、この間は他人への感染力がなく、きわめて感染性が低いと考えられている。発症初期には発熱および咳が出て、弱い感染力があり、その後肺炎が重症となる時期に感染力が強くなると考えられている。従って、ウイルス遺伝子の検出による診断は呼吸器症状が開始する頃となり、初期診断は困難である可能性が強い。

#### E. 結論

各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピト-

プは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1. Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C., Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T.: Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

2. Itoyama, S., Keicho, N., Quy, T., Phi, N.C., Long, H.T., Ha, L.D., Ban, V.V., Ohashi, J., Hijikata, M., Matsushita, I., Kawana, A., Yanai, H., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: ACE1 polymorphism and progression of SARS. *Biochem Biophys Res Commun.*, 323: 1124-1129, 2004.

3. Emi Hamano, Minako Hijikata, Satoru Itoyama, Quy Tran, Phi Chi Nguyen, Long Thuy Hoang, Ha Dang Le, Ban Van Vo, Ikumi Matsushita, Hideki Yanai, Fumiko Kirikae, Teruo Kirikae, Tadatashi Kuratsuji, Takehiko Sasazuki: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA Associated with SARS in the Vietnamese population. BBRC, in press.

4. Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phy NG, BanVV, Ha Le D, Long HT, Keicho N, Kirikae T, Sasazuki T, Anderson RM. Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam Amer J.Trop Med Hygiene 2005 in press.

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

【伊東恭悟 主任研究者】  
なし

【笹月健彦 分担研究者】  
なし

【七條茂樹 分担研究者】  
なし

【切替照雄 分担研究者】  
なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

【伊東恭悟 主任研究者】  
なし

【笹月健彦 分担研究者】  
なし

【七條茂樹 分担研究者】  
なし

【切替照雄 分担研究者】  
切替照雄：SARSのウイルス学。医療：58巻(3)  
138-142、2004.

1-4. 論文発表 (著書)

【伊東恭悟 主任研究者】  
なし

【笹月健彦 分担研究者】  
なし

【七條茂樹 分担研究者】  
なし

【切替照雄 分担研究者】  
なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

【伊東恭悟 主任研究者】  
なし

【笹月健彦 分担研究者】  
なし

【七條茂樹 分担研究者】  
なし

【切替照雄 分担研究者】  
なし

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)

【伊東恭悟 主任研究者】  
なし

【笹月健彦 分担研究者】  
なし

【七條茂樹 分担研究者】  
なし

【 切替照雄 分担研究者 】

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

免疫によって認識される重症急性呼吸器症候群  
コロナウイルス由来ペプチド、特願2004-044873  
(2004. 8. 18)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし





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

ウイルスゲノム解析による抗体測定用ペプチドの選択および感染患者血清の入手に関する研究

分担研究者 笹月 健彦 国立国際医療センター総長

研究要旨:(目的)SARSウイルスのゲノムを解析し、抗体測定のためのタンパク由来ペプチドを決定する。また、患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体によって認識されるエピトープを同定するための血清が日本では手に入らないことから、国際的共同研究により感染者および対照健康人血清を入手することを当分担研究者の目的とする。(結果)SARS-CoVゲノムは、非構造タンパク質遺伝子が約70%を占めており、これらのタンパク質に対する抗体の認識エピトープを調べるためのペプチドを合成することは非現実的であると考えられる。本研究では治療を視野に入れた中和抗体のエピトープを調べることを目的に、ゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス構造タンパク(spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)、純度70%以上で合成することにした。一方、感染者血清は台湾のJen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より急性期SARS感染者血清3例を伊東統括研究者と共に、またベトナムHanoi French HospitalおよびMai Hospitalより感染後6ヶ月後の血清を接触者結成および健康人血清と共に入手した。(考察)接触者は医療関係者が中心で、接触の度合い、患者との位置関係、接触した際の装備の違いなど、アンケート情報が整っているため、抗体の有無、抗体力価の違いなどとの関連の解析が待たれる。なお、本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。

#### A. 研究目的

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」は2002年に中国で発生し、短期間のうちに世界中に伝播した。患者数8000人のうち、約1割の800人が死亡するということから、日本でも診断や治療の開発などの早急な対策が求められた。幸い日本では発症例はなかったが、反面診断・治療研究のための試料が入手できないことを意味する。ベトナムは徹底した隔離と適切な院内感染対策を迅速に実施し、正しい情報のもとに外国の支援を受け入れ、SARS征圧に成功した良い例である。そこで、これらの感染者の発生した国との共同研究により、ウイルスの構造タンパク由来ペプチドの中から、患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体によって認識されるエピトープを同定するための患者血清を入手することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 血清収集、管理

SARS感染患者血清; 感染初期に3名の台湾人より採血した血清をJen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より伊東統括責任者の協力の下入手した。50名の健康人、230人の発症しなかった医療従事者(接触非感染者)および45名のSARS感染後6ヶ月に採血した患者血清はベトナムの

Hanoi French HospitalおよびMai Hospitalより入手した。

健康人、インフルエンザ、HCV感染者血清、自己免疫(RA, SLE)患者血清は久留米大学病院および久留米大学医療センターより伊東、七條らが入手した。いずれも患者のインフォームドコンセントを得て採血した。血清は、切替分担研究者が直ちに加熱非動化処理し、高度安全管理室内の専用超低温槽に施錠して保管した。

##### ペプチド

SARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス構造タンパク(spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)選んだ。スクリーニングの結果得られたペプチドに関しては、純度90%以上で再合成し、抗体の反応性、特異性などの確認を行う。

##### (倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立

国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り採血して研究に供している。

### C. 研究結果

SARSは、2002年11月中国広東省で第一症例と考えられる患者が異型肺炎で入院したことから始まった。依頼、この新興感染症は院内感染を中心に広州市で拡大すると共に、香港、ベトナム、シンガポール、カナダ、台湾、北京などを中心に世界30カ国以上に伝播し、患者数8000人と死亡約800人に上る大流行となった。WHOの他施設共同研究ネットワークの参加施設を中心とした世界規模の研究体制によって、SARSの原因ウイルスが新規のSARS-CoVであることが明らかにされ、数週間後には全ゲノムが解読されている。

SARS-CoVを含むコロナウイルスのゲノムは、約30kbの(+)鎖RNAからなる。これは、RNAとしてはもっとも大きく、レトロウイルスの場合の3から4倍もある。5'末端にはコロナウイルス特異的な配列のコアを持つleader sequence(G2)があり、その下流にRNA polymerase(replicase 1a, replicase 1b)遺伝子がある。非構造タンパク質遺伝子が約70%を占めており、これらのタンパク質に対する抗体の認識エピトープを調べるためのペプチドを合成することは非現実的であると考えられる。本研究では治療を視野に入れた中和抗体のエピトープを調べることを目的に、ゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス構造タンパク(spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)、純度70%以上で合成することにした。

一方、SARS-CoV感染者は、幸いにも日本では発生していないが、世界における人的交流のスピードと交流範囲の拡大を考えると、早期診断法の確立およびワクチン開発は避けて通れない。そこで、SARS-CoV感染により誘導される抗体が認識するエピトープペプチドを同定するために、感染者血清を台湾の Jen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より急性期SARS感染者血清3例を伊東統括研究者と共に、またベトナムHanoi French HospitalおよびMai Hospitalより感染後6ヶ月後の血清を接触者結成および健康人血清と共に入手した。患者からのインフォームドコンセントはそれぞれの国の担当医によってなされた。

血清の管理は、切替分担研究者により適切に行われた。

即ち、入手後研究に使用するまでの間、熱非動化処理後、分注して高度安全管理室(P3相当)内の鍵付き専用超低温槽に保管した。

実験操作は全て切替分担研究者の指導監督下、高度安全管理室(P3相当)内で行った。患者血清は実験使用後、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

### D. 考察

SARS-CoV遺伝子の核酸配列や、この遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列の相同性を検索すると、bovin corona virus、poachin epidemic diarrhoea virus、murine hepatitis virus、transmissible gastroenteritis virus、avian infectious bronchitis virus、など多くのウイルスが該当する。従って、タンパク質抗原を用いたELISAで抗体を測定すると、交差反応性抗体が検出される可能性がある。各種SARS-CoV由来オーバーラップペプチドに対する抗体を測定した場合も、ペプチドによっては健康人でも高頻度に検出される場合があった。一方、SLE患者血清でも、SARS-CoV由来のタンパク抗原を用いたELISAで測定すると交差反応が認められることが報告(Wang et al, 2003)されている。オーバーラップペプチドに対する抗体の測定でも、SLE患者血清で交差反応するペプチドが検出され、自己抗原に対する抗体がSARS-CoV由来ペプチドと交差反応することが示唆された。これらのことから、健康人血清、各種感染症、自己免疫疾患などの患者血清中抗体が交差反応しない特定のペプチド抗原を選別し、診断用ペプチドを決定する。即ち本研究で同定した3種類のペプチドを用いた抗体の測定は特異性を確保する意味からも有用であることが示唆された。

タンパク質抗原には通常MHCクラスII分子に結合できる複数のペプチド配列が存在するため、CD4 T細胞に働くタンパク質抗原のほとんどは $T_H1$ 細胞と $T_H2$ 細胞のいずれをも誘導する。このうち、あるペプチドはMHCクラスII分子に高い親和性をもって結合し、その結果、抗原提示細胞表面に高い濃度で提示されるが、あるものは弱い親和性しか持たず、従って抗原提示細胞上には低い濃度でしか提示されない。従ってMHC分子に対して高い親和性を持つペプチドに特異的なナイーブT細胞は、高濃度のリガンドと出会いやすく、一方親和性の低いペプチドに特異的なT細胞は低濃度のリガンドにだけしか出会わないこととなり、このことはその後のT細胞の反応様式に大きな影響を与えることとなる(Constant SL and Bottomly K, Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu. Rev. Immunol., 1997, 15: 297-322)。実際、一つの抗原内で一つの

ペプチドがTH1細胞を、別のペプチドがTH2細胞を誘導する例があることが、ある特定の抗原において実験的に示されている。このような観点から、各エピトープに対する免疫応答と個々の感染者での予後の良否、血中ウイルス量の違い、などとの関連性の今後の解析が待たれる。

Nucleocapsid(N)は、抗原性が高いSARSウイルス由来のタンパク質であるが、このタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いたantigen capture ELISAをDiら(Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12, 135-40)は開発し、発症後における抗体の出現を経時的に解析した。発症後1-5、6-10、11-15、および16-20日で、陽性率はそれぞれ92.9、69.8、36.4、および21.1%と、急性期で最も高くその後次第に減少することが明らかにされた。本研究で同定された3種類のペプチドに対する抗体は、6ヵ月後でS791, M207, およびNI61 に対してそれぞれ51%、60%および42%といずれも高い陽性率を示していることからペプチドに対する抗体測定の実用性が示唆された。

抗体の検出がSARS感染を診断する上でどのような意味を持つのか慎重に解析し検討する必要がある。すなわち、インフルエンザの場合は発熱して受信する頃が最もウイルス排泄が多く、クロマトチェンバーを用いたウイルス検出による迅速診断が有用であると考えられる。インフルエンザと比べて、SARSの場合は潜伏期間が通常感染後2から7日(最大10日程度)で、この間は他人への感染力がなく、きわめて感染性が低いと考えられている。発症初期には発熱および咳が出て、弱い感染力があり、その後肺炎が重症となる時期に感染力が強くなると考えられている。従って、ウイルス遺伝子の検出による診断は呼吸器症状が始まる頃となり、初期診断は困難である可能性が高い。

#### E. 結論

各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1. Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C.,

Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T.: Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

2. Itoyama, S., Keicho, N., Quy, T., Phi, N.C., Long, H.T., Ha, L.D., Ban, V.V., Ohashi, J., Hijikata, M., Matsushita, I., Kawana, A., Yanai, H., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: ACE1 polymorphism and progression of SARS. *Biochem Biophys Res Commun.*, 323: 1124-1129, 2004.

3. Emi Hamano, Minako Hijikata, Satoru Itoyama, Quy Tran, Phi Chi Nguyen, Long Thuy Hoang, Ha Dang Le, Ban Van Vo, Ikumi Matsushita, Hideki Yanai, Fumiko Kirikae, Teruo Kirikae, Tadatoshi Kuratsuji, Takehiko Sasazuki: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA Associated with SARS in the Vietnamese population. BBRC, in press.

4. Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phy NG, BanVV, Ha Le D, Long HT, Keicho N, Kirikae T, Sasazuki T, Anderson RM. Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam Amer J.Trop Med Hygiene 2005 in press.

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)  
なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)  
なし

1-4. 論文発表 (著書)  
なし

#### 2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)  
なし

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

免疫によって認識される重症急性呼吸器症候群  
コロナウイルス由来ペプチド、特願2004-044873  
(2004. 8. 18)

##### 2. 実用新案登録

特になし

3. その他  
特になし

フローメトリーによる抗ペプチド抗体の測定に関する研究

分担研究者 七條 茂樹 久留米大学医学部助教授

研究要旨:(目的)フローメトリーにより多数の候補ペプチドの中から抗体エピトープを選択することにより、SARSウイルス感染患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体によって認識されるエピトープを同定することを目的とする。(方法)抗原結合蛍光ビーズを用いたフローメトリーにより、少量の血清で迅速かつ安全に測定できる方法を確立した。(結果)SARSウイルスの構造タンパク由来15残基のアミノ酸からなる5残基オーバーラップペプチド197種類を3名の急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42種類のペプチドが陽性であった。これらのペプチドのうち、健常人・非SARS感染患者血清に比べて感染6ヶ月後に採血した患者(45名)血清で認識されるペプチドを3種類(S791, M207, N161)同定した。(考察)各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。なお、本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。

A. 研究目的

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」は感染経路が特定されていないなど再流行の可能性は依然残ったままである。更に、昨年は鳥インフルエンザが流行し新興感染症に対する対策が急務である。これらの新興感染症は、治療法や診断法などに関して未だ不明な点が多い。そこで、SARSウイルスの構造タンパク由来ペプチドの中から、患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体によって認識されるエピトープを同定し、これらを用いた迅速診断法を確立する。

B. 研究方法

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488.2) からウイルス構成タンパク (spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)、純度70%以上で合成した。スクリーニングの結果得られたペプチドに関しては、純度90%以上で再合成し、抗体の反応性、特異性などの確認を行った。各ペプチドはdimethylsulfoxide(DMSO)に10mg/mlの濃度で溶かし、-20℃で保存した。100μlのcolor-coded beadsを100μlのペプチド(1mg/ml in morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer、pH4.5)と混ぜ、これを1mg/mlの

-propyl]carbodiimide-2(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (EDC)と室温暗所で30分間静置した後、Tween-20 phosphate buffered saline (T-PBS)で洗浄した。ビーズを2-aminoethanolと室温暗所で10分間処理した後、2回洗浄し、1mlの0.05% Block Ace in T-PBSに懸濁した。

各種ペプチドに対する抗体は、Luminexを用いたflowmetryで行った。即ち、100から10000倍に希釈した血清(または血漿)2μlを、ペプチドを結合させたcolor-coded beads 25μlと室温、2時間96穴フィルタープレート上でインキュベートした。その後、ビーズを洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗ヒトIgGと室温で1時間反応させた。更に、洗浄後、100μl streptavidin-PEと室温で30分間反応させた後3回洗浄し、100μlのT-PBSに再懸濁した後、Luminexで測定した。

実験操作は全て切替分担研究者の指導監督下、高度安全管理室(P3相当)内で行った。N95以上の性能のある感染防御マスク、使い捨てガウン、使い捨てエプロン、使い捨て手袋(2重)、汚染除去可能な履物(ゴム長靴)、ゴーグル、必要に応じて顔面カバー等を使用して実験を行った。実験使用後は、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

(倫理面への配慮)

1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当

しない。

2) 本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り採血して研究に供している。

### C. 研究結果

実験操作は全て切替分担研究者の指導監督下、高度安全管理室(P3相当)内で行った。患者血清は実験使用後、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

SARSウイルスの構造タンパク由来15残基のアミノ酸からなる5残基オーバーラップペプチド197種類を3名の急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42種類のペプチドが陽性であった。Nucleocapsid (N) が15、spike (S)が20、および membrane (M) が7種類で、envelope (E) の陽性ペプチドはなかった。以上の結果は、nucleocapsid (N) およびSpike (S) の免疫原性が強いことが示唆され、他の報告とも一致した。なかでも、spike タンパク質の791-805番目のアミノ酸からなるペプチド(S791)が最も高い測定値を示した。同様に nucleocapsid の161-175番目のアミノ酸からなるペプチド(N161)も高値を示した。

これら42種類のペプチドのうち、健常人および接触非感染者血清に比べて感染6ヶ月後に採血した患者(45名)血清で有意(Student's t-test および Mann-Whitney test) に認識されるペプチドを3種類(S791, M207, N161) 同定した。

これら3種類のペプチドに対する抗体を健常人の測定値から求めたカットオフ値で陽性割合を算出したところ、抗S791が患者、接触非感染者、および健常人に対してそれぞれ51%、7.8%、および8%であった。同様に、抗M207に対して、それぞれ60%、4.3%、および6%で、抗N161に対して、それぞれ42%、9.1%、および4%であった。

他の感染症や自己免疫疾患における血清中抗体の交差反応性を調べる目的で日本人C型肝炎(12名)、インフルエンザ(12名)、リュウマチ(15名)、SLE(10名)、および日本人健常人(27名)で調べたところ、先の3種類のペプチドに対する交差反応は認められなかった。

抗原ペプチドに対する抗体の特異性を確認する目的で、固相化したペプチドでの吸収実験を行った。対応するペプチドで特異的に吸収され、それ以外の用いた

ペプチドでは吸収されなかったことから、感染者血清中で検出された3種類のペプチドに対する抗体は抗原特異的であることが示唆された。

### D. 考察

タンパク質抗原には通常MHCクラスII分子に結合できる複数のペプチド配列が存在するため、CD4 T細胞に働くタンパク質抗原のほとんどは $T_H1$ 細胞と $T_H2$ 細胞のいずれをも誘導する。このうち、あるペプチドはMHCクラスII分子に高い親和性をもって結合し、その結果、抗原提示細胞表面に高い濃度で提示されるが、あるものは弱い親和性しか持たず、従って抗原提示細胞上には低い濃度でしか提示されない。従ってMHC分子に対して高い親和性を持つペプチドに特異的なナイーブT細胞は、高濃度のリガンドと出会いやすく、一方親和性の低いペプチドに特異的なT細胞は低濃度のリガンドにだけしか出会わないこととなり、このことはその後のT細胞の反応様式に大きな影響を与えることとなる(Constant SL and Bottomly K, Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu. Rev. Immunol., 1997, 15: 297-322)。実際、一つの抗原内で一つのペプチドがTH1細胞を、別のペプチドがTH2細胞を誘導する例があることが、ある特定の抗原において実験的に示されている。このような観点から、各エピトープに対する免疫応答と個々の感染者での予後の良否、血中ウイルス量の違い、などとの関連性の今後の解析が待たれる。

本研究では、ペプチドに対する抗体の測定をLuminexを用いたflowmetry法で行った。この方法による測定では、1)微量の血清量で抗体の測定が可能、2)最大100種類の抗原に対する抗体が同時に測定できる、3)ELISAと比べて操作が簡単で、洗浄に使用する緩衝液の量も少なく済む、などの利点がある一方、4)高額の測定機器が必要、5)ELISAでの測定結果と異なる場合がある、6)同時に測定する場合の抗原の組み合わせによっては測定値が異なる場合がある、などの欠点、あるいは今後検討して明らかにすべき問題点も残されている。しかしながら、本研究では1~3の理由から本法を選択した。本研究で同定した3種類のペプチドに対する抗体をELISA法でも測定したところ、相関性のある測定結果が得られた。

Wangら(Shi Yan Sheng Wu Xue Bao 2003, 36, 314-7)もSARS感染者血清抗体が認識する4種類のペプチドを報告しており、そのうちの一種類N66(161-175)はN161よりC-末端が7-アミノ酸残基長いペプチドで、nucleocapsidのこの部位が最も高い抗

原性の一つを有することが示唆された。一方、S791は疎水性領域であるためWangらは抗体の測定を行っていない。

Nucleocapsid(N)は、抗原性が高いSARSウイルス由来のタンパク質であるが、このタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いたantigen capture ELISAをDiら(Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12, 135-40)は開発し、発症後における抗体の出現を経時的に解析した。発症後1-5、6-10、11-15、および16-20日で、陽性率はそれぞれ92.9、69.8、36.4、および21.1%と、急性期で最も高くその後次第に減少することが明らかにされた。本研究で同定された3種類のペプチドに対する抗体は、6か月後でS791, M207, およびN161 に対してそれぞれ51%、60%および42%といずれも高い陽性率を示していることからペプチドに対する抗体測定の有用性が示唆された。

抗体の検出がSARS感染を診断する上でどのような意味を持つのか慎重に解析し検討する必要がある。すなわち、インフルエンザの場合は発熱して受信する頃が最もウイルス排泄が多く、クロマトチェンバーを用いたウイルス検出による迅速診断が有用であると考えられる。インフルエンザと比べて、SARSの場合は潜伏期間が通常感染後2から7日(最大10日程度)で、この間は他人への感染力がなく、きわめて感染性が低いと考えられている。発症初期には発熱および咳が出て、弱い感染力があり、その後肺炎が重症となる時期に感染力が強くなると考えられている。従って、ウイルス遺伝子の検出による診断は呼吸器症状が開始する頃となり、初期診断は困難である可能性が高い。

#### E. 結論

各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Qry, T., Phi, N.-C., Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T.: Assessment of

synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

##### 1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

なし

##### 1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

なし

##### 1-4. 論文発表 (著書)

なし

#### 2. 学会発表

##### 2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

なし

##### 2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし





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感染者血清の管理、SARS研究マニュアル策定および抗体測定に関する研究

分担研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨:(目的)SARSは、2002年11月中国広東省広州市の隣の仏山市在住の男性が第一症例と考えられ、依頼院内感染を中心に広州市で拡大すると共に、世界30カ国以上に伝播し、患者数8000人と死亡約800人にのぼる大流行になった。この感染症の原因ウイルスが新たなSARS-CoVであることが明らかにされたことから、感染患者血清を用いてSARSウイルスの構造タンパクエピトープをでスクリーニングすることにした。その際、原因ウイルスの感染経路、感染性、病原性などがわかっていないため、血清の管理および実験プロセスの安全確保を目的としたマニュアルを作成した。(結果)患者結成の保管および抗体測定は、国立国際医療センター研究所内の高度安全管理室(P3に準じた)で行うことにした。急性期患者血清でスクリーニングしたところ42種類のペプチドが陽性であった。これらのペプチドのうち、健常人・非SARS感染患者血清に比べて感染6ヶ月後に採血した患者(45名)血清で認識されるペプチドを3種類(S791, M207, N161)同定した。(考察)各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。なお、本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。

#### A. 研究目的

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」は、2002年11月中国広東省広州市の隣の仏山市在住の男性が第一症例と考えられ、依頼院内感染を中心に広州市で拡大すると共に、香港、ベトナム、シンガポール、カナダ、台湾、北京などを中心に世界30カ国以上に伝播し、患者数8000人と死亡約800人にのぼる大流行になった。この感染症の原因ウイルスが新たなSARS-CoVであることが明らかにされたことから、感染患者血清を用いてSARSウイルスの構造タンパクエピトープをでスクリーニングすることにした。その際、原因ウイルスの感染経路、感染性、病原性などがわかっていないため、血清の管理および実験プロセスの安全確保を目的としたマニュアルを作成した。

#### B. 研究方法

##### 血清収集、管理

SARS感染患者血清; 伊東、笹月を中心に感染初期の3名の台湾人より採血した血清はJen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より入手した。50名の健常人、230人の発症しなかった医療従事者(接触非感染者)および45名のSARS感染後6ヶ月に採血した患者血清は笹月を中心にベトナムのHanoi French HospitalおよびMai Hospitalより入手した。

健常人、インフルエンザ、HCV感染者血清、自己免疫(RA, SLE)患者血清は伊東、七條が中心に久留米大学病院および久留米大学医療センターより入手した。いずれも患者のインフォームドコンセントを得て採血した。血清は、切替が管理責任者として直ちに加熱非動化处理し、高度安全管理室内の専用超低温槽に施錠して保管した。

抗体の測定は、七條分担研究員と共同で行った。

SARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス構成タンパク(spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E))由来の15merペプチドをそれぞれ125、43、22、7種類(合計197種類)、純度70%以上で合成した。各ペプチドはdimethylsulfoxide(DMSO)に10mg/mlの濃度で溶かし、-20℃で保存した。

各種ペプチドに対する抗体は、Luminexを用いたflowmetryで行った。即ち、100から10000倍に希釈した血清(または血漿)2μlを、ペプチドを結合させたcolor-coded beads 25μlと室温、2時間96穴フィルタープレート上でインキュベートした。その後、ビーズを洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗ヒトIgGと室温で1時間反応させた。更に、洗浄後、100μl streptavidin-PEと室温で30分間反応させた後3回洗浄し、100μlのT-PBSに再懸濁した後、Luminexで測定した。

(倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 本研究は、ベトナム保健省の倫理委員会及び国立国際医療センター倫理委員会の承認の基に実施している。血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り採血して研究に供している。

### C. 研究結果

#### 実験操作マニュアルの作成

1. 血清の非動化、分注、保管および抗体測定は高度安全管理室(P3相当)内で行う。
2. 高度安全管理室入室に際して、入室者の入退出記録を行う。
3. N 95以上の性能のある感染防御マスク、使い捨てガウン、使い捨てエプロン、使い捨て手袋(2重)、汚染除去可能な履物(ゴム長靴)、ゴーグル、必要に応じて顔面カバー等を使用して実験を行う。
4. 試料を用いた実験操作は、安全キャビネット内で行う。
5. 実験は、管理責任者の説明およびトレーニング後、指導監督下に行う。
6. 実験使用後の試料および廃液は次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄する。
7. 使用器具は、次亜塩素酸処理後、可能なものはオートクレーブ処理する。

#### 台湾およびベトナムから入手した血清の管理及び血清を用いた実験操作

マニュアルに沿って以下の如く行った。

1. 血清の管理は、以下の如く適切に行った。即ち、入手後研究に使用するまでの間、熱非動化処理後、分注して高度安全管理室(P3相当)内の鍵付き専用超低温槽に保管した。
2. 実験操作は全て高度安全管理室(P3相当)内で行った。抗体測定は七條分担研究者と共同で行い、患者血清は実験使用後、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

#### 抗体測定結果

1. 急性期感染患者血清でスクリーニング: SARSウイルスの構造タンパク由来15残基のアミノ酸からなる5残基オーバーラップペプチド197種類のうち42種類のペプチドが陽性であった。
2. 感染6ヶ月後に採血した患者(45名)抗血清でスクリーニング: 上記42種類のペプチドのうち、健常人

および接触非感染者血清に比べて有意(Student's t-testおよび Mann-Whitney test) に認識される3種類のペプチド(S791, M207, N161)を同定した。

3. 各ペプチドに対する抗体陽性率: 上記3種類のペプチドに対する抗体を健常人の測定値から求めたカットオフ値で陽性割合を算出したところ、抗S791が患者、接触非感染者、および健常人に対してそれぞれ51%、7.8%、および8%であった。同様に、抗M207に対して、それぞれ60%、4.3%、および6%で、抗N161に対して、それぞれ42%、9.1%、および4%であった。
4. 抗体のペプチド特異性の検討: 他の感染症や自己免疫疾患における血清中抗体の交差反応性を調べる目的で日本人C型肝炎(12名)、インフルエンザ(12名)、リュウマチ(15名)、SLE(10名)、および日本人健常人(27名)で調べたところ、先の3種類のペプチドに対する交差反応は認められなかった。
5. 抗原ペプチドに対する抗体の特異性の確認: 固相化したペプチドでの吸収実験を行った。対応するペプチドで特異的に吸収され、それ以外の用いたペプチドでは吸収されなかったことから、感染者血清中で検出された3種類のペプチドに対する抗体は抗原特異的であることが示唆された。

### D. 考察

SARSの原因ウイルスであるSARS-CoVは新種のウイルスで、感染経路、重症化の機序、診断法が確立されていない、などの観点から患者血清の取扱には十分考慮を要する。

当該ウイルスが熱に対して感受性があるという情報から、一般的に抗体活性に影響が少ない条件で血清を熱処理し、分注して保存した。

本研究では、ペプチドに対する抗体の測定を行うにあたり、微量の血清量で抗体の測定が可能、最大100種類の抗原に対する抗体が同時に測定できる、およびELISAと比べて操作が簡単で、洗浄に使用する緩衝液の量も少なくて済む、などの利点があることから、上記の物理学的および生物学的封じ込めのための実験系を確立する上でLuminexを用いたflowmetry法が適当であると考えられた。

各エピトープに対する免疫応答と個々の感染者での予後の良否、血中ウイルス量の違い、などとの関連性の今後の解析が待たれる。特に、SARS-CoVが有する高い病原性には、宿主の免疫の過剰反応が関与していることが推定されていることから、細胞性および液性免疫応答の解析が重要であると考えられる。

### E. 結論

各種SARSウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。また、本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、感染直後から惹起されることから、診断のための抗原としても有用であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1. Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C., Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T.: Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

2. Itoyama, S., Keicho, N., Quy, T., Phi, N.C., Long, H.T., Ha, L.D., Ban, V.V., Ohashi, J., Hijikata, M., Matsushita, I., Kawana, A., Yanai, H., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: ACE1 polymorphism and progression of SARS. *Biochem Biophys Res Commun.*, 323: 1124-1129, 2004.

3. Emi Hamano, Minako Hijikata, Satoru Itoyama, Quy Tran, Phi Chi Nguyen, Long Thuy Hoang, Ha Dang Le, Ban Van Vo, Ikumi Matsushita, Hideki Yanai, Fumiko Kirikae, Tenuo Kirikae, Tadatashi Kuratsuji, Takehiko Sasazuki: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA Associated with SARS in the Vietnamese population. BBRC, in press.

4. Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phy NG, BanVV, Ha Le D, Long HT, Keicho N, Kirikae T, Sasazuki T, Anderson RM. Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam Amer J.Trop Med Hygiene 2005 in press.

###### 1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

なし

###### 1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

切替照雄: SARSのウイルス学. 医療: 58巻(3) 138-142, 2004.

###### 1-4. 論文発表 (著書)

なし

#### 2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)  
なし

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

