

200500641A

厚生労働科学研究費補助金

平成17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18年3月

主任研究者 森川 茂  
(国立感染症研究所)

## 目 次

I. 総括研究報告書	
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）	
II. 分担研究報告書	
1. 組換えSARS-CoV抗原を用いたIgM捕獲ELISA法の開発 .....	15
分担研究者：森田 公一（長崎大学・熱帯医学研究所）	
2. VSV-pseudotype によるSARS-CoV迅速中和抗体測定 .....	19
分担研究者：福士秀悦（国立感染症研究所・ウイルス第1部）	
3. 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 .....	25
分担研究者：松浦善治（大阪大学・微生物病研究所）	
4. SARS コロナウイルスの迅速抗原検出キットの開発 .....	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）	
5. SARS/RT-LAMP検出試薬開発と臨床評価 .....	37
分担研究者：田代真人（国立感染症研究所・ウイルス第3部）	
6. 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）	
7. SARS 鑑別診断法の開発 .....	47
分担研究者：北村義浩（東京大学・医科学研究所）	
8. 改良Representational difference analysis (RDA法)を用いたSARS-CoVの検出 .....	51
主任研究者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部）	
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 -小動物を用いた感染モデルの開発- .....	63
分担研究者：永田典代（国立感染症研究所、感染病理部）	
10. 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 .....	67
分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）	
11. ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウス組織へのSARS-CoV感染 .....	71
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ある。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、我が国で感染者が発生すること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。さらに、SARS のような新興ウイルス感染症発生時に、病原ウイルスの特定と遺伝子情報を迅速に得られるようなシステムの開発も重要である。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初年度に続いて研究を行い、本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。この抗原を用いた IgM 捕獲 ELISA を開発し、抗体検出までの window period を短縮することができた。また、SARS-CoV の外被蛋白（S 蛋白）の単クローン抗体を用いた Sandwich ELISA 系で高感度に S 蛋白を検出できたため、迅速なイムノクロマト法開発を行う。抗体検査の gold standard であるウイルス中和抗体測定法を安全かつ迅速に行うために、ヒト検体を用いて昨年度作製した SARS-CoV の S 蛋白を被った VSV-pseudotype と SARS-CoV を用いた中和試験を比較した。その結果、VSV-pseudotype による中和試験は感度、特異性ともに優れていた。さらに、SARS-CoV 特異的中和抗体測定が 10 時間で可能になった。また、外被蛋白(gp64)遺伝子を欠失し S 蛋白を被せた gp64(-)バキュロウイルスを作製したが、ACE2 依存的感染が確認できなかった。SARS-CoV ゲノム検出に関しては、LAMP 法の感度向上を目的として、ヘパリン・ラクトフェリンの阻害の影響の小さな逆転写酵素の使用及び RT-LAMP 反応系に RNase inhibitor の添加に関して検討した結果、感度向上効果が期待できた。RNA 抽出キットに関しては、Qiagen 抽出キットが比較的安定した成績を

示し、さらに抽出 RNA を濃縮することで 5-10 倍高感度になった。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用 LAMP 法に関しては、インフルエンザウイルス A, B、ヒトコロナウイルス 229E、マイコプラズマ検出用 LAMP 法が開発できた。さらに新興ウイルス感染症発生時に、ウイルスの遺伝子情報が不明でもその遺伝子を増幅する方法として改良 RDA 法を開発した結果、SARS-CoV 遺伝子の検出がウイルス特異プライマーを使用しなくても可能であることを明らかにした。SARS-CoV 感染小動物モデル系の開発をウイルスの *in vivo* 継代とヒト ACE2 トランスジェニックマウスの作製の両面から行った。その結果、ラットで 10 代継代した SARS-CoV は、S 蛋白の ACE2 結合領域の 1325 位のアミノ酸が置換(Tyr to Ser)し、ラットでのウイルス増殖および病変形成の増加が認められた。ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの肺、腎初代培養細胞での SARS-CoV 増殖を解析した結果、対照マウス由来細胞に比べ 100,000 倍以上のウイルス増殖が認められ、非常に有用なモデル動物となる可能性が示唆された。SARS-CoV 感染サル気管内接種後 7 日目の肺、肺門リンパ節の他、脾、腸間膜リンパ節および胃から直腸におよぶ腸管から感染性ウイルスあるいはウイルスゲノムが検出され、開発した診断システムを統括的に評価する際のサンプルとして有効利用できる。

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 部部長)  
 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 部部長)  
 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)  
 福士秀悦 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部)  
 永田典代 (国立感染症研究所感染病理部)

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ある。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ことを想定して対応することが必要である。SARS の初期症状は、インフルエンザ等のそれと類似し臨床的な鑑別は不可能であることから、より高感度で迅速な実験室診断が求められる。また、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とから、ウイルス培養を必要としない安全な実験室診断体制の確立は急務である。SARS が臨床で疑われた場合、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ができる。SARS コロナウイルス(SARS-CoV)特異抗体は、ウイルス抗原を用いた抗体検出系では、発症後 9 日程度から検出できるが、

組換え抗原を用いた高感度検出系によりその window 期間をできるだけ短縮する必要がある。また、他のヒトコロナウイルスとの抗原性の交叉にも留意する必要がある。一方、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ため、より高感度にできるよう改良が必要である。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。さらに、SARS の様な新興ウイルス感染症が発生した場合に、ウイルス遺伝子情報が未知の時点でも遺伝子増幅が可能であれば、病原ウイルスの同定や検査系の開発はるかに短縮できる。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。本年度は、3 年計画の 2 年目にあたるが、ウイルス培養の必要のない組換え抗原による IgM 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、抗原検出のためのイムノクロマト法の開発、LAMP 法による SARS-CoV 検出の至適化と改善、迅速鑑別診断用 LAMP 法の開発、改良 RDA 法によるウイルス特異的プライマーを用いないウイルス遺伝子増幅法の開発・評価、ラット継代による SARS-CoV の馴化と病原性増強の検討、ACE2-トランスジェニックマウス細胞でのウイルス増殖の増強、サル

SARS-CoV 感染系の解析を行った。これらにより、より迅速で安全な実験室診断法を統括的に開発することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた IgM 抗体検出法の開発と評価：

SARS-CoV の N 蛋白の 5' 末端側に His-tag を付加し、N 末端 121 残基を除いた N<sub>Δ121</sub> を用いた。抗ヒト IgM 抗体で検体中の IgM を捕獲し、N<sub>Δ121</sub> 反応後、抗 N<sub>Δ121</sub> マウス抗体および抗マウス IgG-HRPD で反応を検出する IgM 捕獲 ELISA を開発した。IgM 捕獲 ELISA の評価には、健康人血清として、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 人の健康人血清と 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。

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

昨年度作製した、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 蛋白を被った VSV シュードタイプウイルスを用いた。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価を測定する系で、2003 年 3-4 月の SARS 流行時にベトナム Hanoi French Hospital の health care worker から採取された 56 血清サンプルを用いて評価した。

(3) SARS-CoV S 蛋白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 SARS-CoV S 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、その感染特異性を検討した。

(4) SARS 迅速抗原検出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単クローン抗体を作製した。得られた S 蛋白に対する単クローン抗体を組み合わせて Sandwich ELISA を行い、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 検出試薬を用い、臨床検体からの RNA 抽出方法の違いによる感度、結果への影響を調べ、より高感度で簡便な方法への改良を図った。また、感度を更に高めるために、RNA 抽出濃縮方法により得られた RNA 標品を用いて LAMP 法を実施し、感度向上が認められるか検討した。

(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 18,000 近辺の領域に設定している。感度向上を目的として、14,000 付近及び 28,000 付近を中心に、さらにプライマーを設計し感度を比較した。また、RT-LAMP 法の初期反応に用いる逆転写酵素のラクトフェリンとヘパリンによる阻害の影響を検討した。を比較検討した。さらに、RNase inhibitor 添加による反応性の向上を検討した。

(7) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の開発に関する基礎研究：

SARS-CoV と初期症状の類似する A 型・B 型インフルエンザウイルス、ヒトコロナウイルス 229E、マイコプラズマを対象とした。これらの対象病原体の増幅対象領域と HIV-1 の p24 遺伝子領域のキメラ核酸を *in vitro* で合成し、それぞれの病原体用にデザインしたプライマーセットによる LAMP 法の感度を内部コントロールの HIV p24 用プライマーセットでの LAMP 法の感度と比較検討した。

(8) 改良 Representational difference analysis (RDA 法)を用いた SARS-CoV の検出：

RDA 法は、未知のウイルス遺伝子の増幅法として理論的に優れた方法であるが、細胞に多量に存在する ribosomal RNA が反応の非特異反応の原因となり実用化されていない。そこで、ribosomal RNA での出現頻度の低い 6mer oligo を 96 種混合したプライマーによる逆転写反応により作製した DNA から、RDA 法を用いて SARS-CoV 特異的プライマーを用いずに SARS-CoV 遺伝子が増幅できるか検討した。

(9) SARS-CoV のラット馴化と病原性増強効果の解析：

SARS-CoV Frankfurt 株をラットに経鼻接種し、感染 3 日目の肺洗浄液をラットに経鼻接種した。この継代を 10 代行い、ウイルス遺伝子の変異、ウイルスの病原性の増強効果を検討した。

(10) 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。

感染後のウイルス分布等を解析して、適切な診断材料、採取時期等に関して検討することを目的とし、肺、扁桃、脾、リンパ節、腎、肝、消化管とその内容物から Vero E6 細胞を用いた感染性ウイルスの分離および real-time PCR 法による遺伝子検出を行った。

(11) ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウス組織への SARS-CoV 感染：

トランスジェニックマウス及び対照マウスの肺および腎臓の初代培養細胞を作製し、SARS-CoV を感染させ、ウイルス増殖を比較検討した。

(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。遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等の使用（第二種使用）の承認を得た。)

### C. 結果

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた IgM 抗体検出法の開発と評価：

組換え SARS-CoV N<sub>Δ121</sub> 蛋白を抗原とした IgM 捕獲 ELISA 法で健康人血清について非特異反応を検討した結果、175 名の健康人全てが陰性で特異度は 100%であった。感度を測定するために、ベトナムの SARS 確定例 36 人から連続的に採取された 150 の血清サンプルについて検討した結果、36 患者の全ての血清で IgM 抗体が検出された。さらに、N<sub>Δ121</sub> 蛋白を抗原とした IgG 抗体、IgM 抗体検出を比較した結果、発症後の抗体陽転時期の中央値は、IgG 抗体は 11 日 (6~21 日) で IgM 抗体は 8 日 (5~17 日) であった。すなわち、発症後の IgG 陽転率は発症後 1 週目 22.22%、2 週目 69.44%、3 週

目 100%で、IgM 陽転率は、1 週目 33.33%、2 週目 97.22%、3 週目 100%だった。

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

ヒト血清 56 サンプルを用いて中和試験を行ったところ VSV-SARS-St19 を用いた中和試験は SARS-CoV を用いた中和試験に比べて感度 97%、特異性 86%であった。VSV-SARS-St19 を用いた場合と、SARS-CoV を用いた場合の中和抗体価には正の相関が認められ、前者の抗体価が高かった。さらに、SARS-CoV を用いた中和試験で陰性であった 3 検体が、VSV-SARS-St19 を用いた中和試験では陽性を示した。この 3 検体は、その後抗体が陽転していることから、VSV-SARS-St19 を用いた中和試験は、より高感度であり検体によっては、window 期間を短縮できると考えられた。

(3) SARS-CoV S 蛋白を被ったシュードタイプバキュロウイルスの作製：

SARS-S および cytoplasmic domain を一部欠損させた SARS-Scyto7 のシュードタイプバキュロウイルスゲノムを、それぞれ昆虫細胞に導入したところ、S 蛋白が発現し、培養上清中より回収した SARS-S および SARS-Scyto7 シュードタイプウイルスからは、S 蛋白が検出され、S 蛋白が取り込まれていることが示された。しかし、両シュードタイプウイルスとも、SARS のレセプターである ACE2 を発現させた 293T および BHK 細胞では感染性が見られなかった。

(4) SARS 迅速抗原検出キット開発のための基礎的研究：

SARS-CoV の S 蛋白に対する単クローン抗体を作製した。得られた 4 種類の単クローン抗体を抗原捕獲抗体に用い、別の単クローン抗体をビオチン化して Sandwich

ELISA を行った結果、高感度で抗原が検出できた。これらの組み合わせで最も感度の高かったものを用いて、イムノクロマト法を行ったところ、目的の位置にバンドは形成されたが、陰性検体でも非特異的なバンドが形成されるため、非特異反応の除去について検討する必要がある。

(5) SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性の検討：

様々な市販 RNA 抽出キットを用いて抽出した RNA 標品について、LAMP 法の感度を比較検討した結果、いずれのキットでもほぼ同様の成績が得られたが、中でも Qiagen 抽出キットが比較的安定した成績を示した。また、感度を更に高めるために、RNA 抽出濃縮方法により得られた RNA 標品を用いて LAMP 法を実施したところ、検出感度は更に 5~10 倍程度上昇した。

(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 nuc.14,000、28,000 近辺の領域でさらにプライマー設計を行ったが、現行のキット以上の成績は得られなかった。このことは、現行キットのプライマーが優れていることを示している。LAMP 法に用いる逆転写酵素による感度を種々の逆転写酵素で比較したが感度向上は認められなかった。しかし、逆転写反応の阻害活性のあるラクトフェリンとヘパリンの影響が小さいものが 1 種みつけた。また、反応溶液に RNase inhibitor を添加することにより RNase の影響抑制に有効であった。

(7) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の開発に関する基礎研究：

HIV-1 p24 遺伝子断片と標的微生物の

標的領域を連結させたキメラ核酸を標的遺伝子として、LAMP 法の感度を正確に比較する系を確立した。この系を用いて、種々のプライマーセットを作製して検討した結果、SARS-CoV は、栄研のプライマーセットが最も高感度であった。A 型インフルエンザウイルスとヒトコロナウイルス 229E に関しては極めて高感度の LAMP 法が確立できた。B 型インフルエンザウイルス、*Mycoplasma pneumoniae* に関しては、HIV-1 p24 検出系と同等か高感度な LAMP 法が作製された。

(8) 改良 Representational difference analysis (RDA 法)を用いた SARS-CoV の検出：

RDA 法は、原理的にはウイルス感染細胞 RNA 由来 cDNA から非感染細胞 RNA 由来 cDNA により細胞 RNA 由来 cDNA を subtract することによりウイルス由来 cDNA を増幅する方法であるが、大量に存在するリボゾーム RNA 由来 cDNA の除去が難しく実用化されていない。そこでリボゾーム RNA には出現頻度が極めて低いが、多くの RNA ウイルスゲノムに広く存在する 6 塩基配列を検索し、96 種類のプライマーを合成した。SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞と非感染細胞から抽出した RNA を用いて、これらの混合プライマーにより RDA 法の逆転写反応を行った結果、最終的に RDA 法で得られた PCR 産物が SARS-CoV の遺伝子由来であることが明らかとなった。この改良 RDA 法は、特定のウイルスを標的とした”specific primer”を用いることなく、感染細胞から SARS-CoV を検出できることから、SARS の様な新興ウイルス感染症発生時に極めて有用な遺伝子検出法であると考えられる。

(9) SARS-CoV のラット馴化と病原性増



強効果の解析：

SARS-CoV Frankfurt 株をラットで *in vivo* 継代した。10 代ラットで継代すると、SARS-CoV の S 蛋白の ACE2 結合領域に一ヶ所アミノ酸の置換変異が認められ、さらにラットに接種すると、接種後 3, 5 日目の組織中のウイルス力価は継代後で有意に増加した。病理組織学的にも肺、上顎でのウイルス抗原陽性細胞の増加と検出期間の延長が認められ、それに伴う炎症反応は増強し広範囲になった。肺では炎症部位が細気管支から肺胞へと広がった。

(10) 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：

気管内接種後 7 日目に解剖したサルにおいて肺、肺門リンパ節の他、脾、腸間膜リンパ節および胃から直腸におよぶ腸管から感染性ウイルスあるいはウイルスゲノムを検出した。接種後 21 日目のサルでは肺門リンパ節以外すべて検出限界以下であった。また、経鼻接種後のサルでは頸部リンパ節と胃から感染性ウイルスが検出され、腸管膜リンパと一部の消化管からウイルスゲノムが検出された。静脈内接種後のサルの脾からウイルスゲノムが検出された。さらに静脈内接種後 14 日目の盲腸と直腸からウイルスゲノムあるいは感染性ウイルスが検出された。これらの一部は、開発された診断法を統括的に評価するための材料として有用である。

(11) ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウス組織への SARS-CoV 感染：

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの 1 ラインについて、目的遺伝子が導入された 8 週令または 10 週令マウス及び同腹の遺伝子導入陰性マウスの摘出肺及び腎臓の初代培養を行ない、SARS-CoV を接種

し 3 日間の観察と培養上清の回収及びウイルス感染価の測定を行った。陽性マウス由来肺及び腎細胞では 2 日から 3 日目には細胞の培養面からの剥離が見られたが、対照マウス由来細胞では見られなかった。培養細胞上清中のウイルス力価を 8 週令または 6 週令各 1 頭の肺由来初代培養細胞ではウイルス接種後 24 時間目で  $2 \times 10^{5.67}$  から  $7.5$  TCID<sub>50</sub>/mL のウイルス増殖が認められた。また、腎由来細胞では  $2 \times 10^5$  から  $6.67$  TCID<sub>50</sub>/ml の増殖が認められた。ウイルス接種後 3 日目では、ウイルス量の減少が見られた。一方、同腹の対照マウス由来培養細胞では腎細胞で 3 日目に少量のウイルスが認められたが、ほとんど検出限界以下であった。これらのことから、本ラインのトランスジェニックマウス由来細胞では SARS-CoV が極めて効率よく増殖することが明らかとなった。今後、トランスジェニックマウスへの SARS-CoV 感染実験を行う予定である。

#### D. 考察

SARS は、2003 年に中国で発生後、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ある。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、SARS-CoV の自然宿主が日本にも分布するキクガシラコモリであることが報告されたことから、今後、輸入感染症としてだけではなく、国内の宿主動物を原因とする SARS 患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、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 N 蛋白の N 末端側の 121 アミノ酸の領域を除くことで特異性を高めることに成功した。この抗原を用いた IgM 捕獲 ELISA を開発し、抗体検出の特異性、感度、抗体検出までの window 期間を短縮することに成功した。また、S 蛋白に対する単クローン抗体を作製し、抗原検出用イムノクロマト法開発の基礎検討を行っている。抗体検査の gold standard であるウイルス中和抗体測定法は BSL3 で行う必要がある、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。この VSV-pseudotype を用いた中和試験は SARS-CoV を用いた中和試験と比べて感度 97%、特異性 86%であった。さらに、VSV-pseudotype を用いた中和試験は、SARS-CoV を用いた中和試験でより高感度であり、検体によっては window 期間を短縮できた。同様の pseudotype をバキュロウイルスベースで作製したが、ACE2 依存的感

染性が見られなかった。今後、原因を明らかにしてより高感度な中和試験法を確立したい。SARS-CoV ゲノム検出に関しては、最も高感度な LAMP 法のさらなる感度向上を目指した結果、RNA 抽出濃縮方法により検出感度は更に 5~10 倍程度上昇した。RT-LAMP 法の初期反応である逆転写反応においては、逆転写反応の阻害活性のあるラクトフェリンとヘパリンの影響が小さい逆転写酵素を 1 種見出した。また、反応溶液に RNase inhibitor を添加することにより RNase の影響抑制に有効であった。プライマーの改良を試みたが、現行のプライマーセット以上の成績は得られなかったことから、現行キットのプライマーが優れていることが明らかになった。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に関しては、A 型インフルエンザウイルスとヒトコロナウイルス 229E に関しては極めて高感度の LAMP 法が確立できた。B 型インフルエンザウイルス、*Mycoplasma pneumoniae* に関しても充分高感度な LAMP 法が作製された。SARS-CoV 感染カニクイサルでは感染後 10 日目以降に血清中の中和抗体および IF 抗体が検出されるが、本年度は、各組織、臓器でのウイルスの動態を昨年度よりさらに詳細に検討した。これらの材料は、これまで開発した種々の検査法の統括的な評価に用いる予定である。より効率のよい SARS-CoV 感染モデル動物を開発するために、SARS-CoV をラットで 10 代 *in vivo* 継代した結果、SARS-CoV の S 蛋白の ACE2 結合領域に一ヶ所アミノ酸置換変異がおき、さらに感染ラットの組織中のウイルス力価は継代後で有意に増加し、病理組織学的にも肺、上顎でのウイルス抗原陽性細胞の増加と検出期間の延長、炎症反応の増強が認められた。また、ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの肺、腎の

初代培養細胞での SARS-CoV の増殖は、対照マウス細胞と比べて 100,000 倍以上のウイルス増殖が認められ、非常に有用なモデル動物となる可能性が示唆された。今後、トランスジェニックマウスへの SARS-CoV 感染実験によりその有用性を検討する。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り、抗体検出の window 期間を短縮できる。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、検出感度を向上させることで、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用 LAMP 法も開発された。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、ラット馴化 SARS-CoV によるラット感染モデルとヒト ACE2 トランスジェニックマウス感染モデルは、より有効なモデル動物系として有用である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-

Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol.12, 848-854, 2005.

2. Fukushi, S., T. Mizutani, M. Saijo, S. Matsuyama, N. Miyajima, F. Taguchi, S. Itamura, I. Kurane, and S. Morikawa. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of General Virology* 86:2269-2274, 2005.
3. Kitagawa Y., Tani H., Limn C-K., Matsunaga T., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses. *Journal of Virology*, 79: 3639-3652, 2005
4. 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*, 23: 2269-2272. 2005
5. Okada M., Takemoto, Y., Okuno, Y., Hashimoto, S. et al. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/Hu mouse models. *The Nidovirus: Toward Control of SARS and Other Nidovirus. Disease*. Springer, New York, *in press*
6. Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N,

- and Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16, 363-373, 2005
7. Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H. Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J. Antibiot.* 58, 65-68, 2005
  8. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46 (2) :236-43, 2006.
  9. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 580 (5) :1417-24. 2006.
  10. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (35) :12543-7, 2005.
  11. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1741 (1-2) : 4-10, 2005
  12. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 66(2-3):159-63, 2005
  13. Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu- Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa 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.* 58(2): 88-94, 2005
  14. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 33(6):e65, 2005
  15. Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J Virol Methods.* 125 (2) :181-6, 2005.
  16. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. *The Nidoviruses: Towards Control of SARS and Other Nidovirus Diseases. in press*

17. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 75:130-136, 2005.
  18. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H. Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 79 (5) : 2910-9, 2005
  19. Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun*, *in press*.
2. 学会発表
    1. Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    2. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    3. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
    4. 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コロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
    5. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシェードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
    6. 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, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
    7. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシェードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多
    8. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARSコロナウイルスの病原性と発症機序の解明. 第94回日本病理学会総会 (2005年4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
Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita.	Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.	Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.	12	848-854	2005
Fukushi, S., T. Mizutani, M. Saijo, S. Matsuyama, N. Miyajima, F. Taguchi, S. Itamura, I. Kurane, and S. Morikawa.	Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein	Journal of General Virology	86	2269-2274	2005
Kitagawa Y., Tani H., Linn C-K., Matsunaga T., Moriishi K., and Matsuura Y.	Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses	Journal of Virology	79	3639-3652	2005
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	23	2269-2272	2005
Okada M., Takemoto, Y., Okuno, Y., Hashimoto, S. et al.	Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/Hu mouse models.	The Nidovirus: Toward Control of SARS and Other Nidovirus. Disease. Springer, New York			in press

Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, and Sugiura W.	A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity.	Antiviral Chemistry and Chemotherapy	16	363-373	2005
Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H.	Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase.	J. Antibiot.	58	65-68	2005
Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells.	FEMS Immunol Med Microbiol.	46 (2)	236-43	2006
Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells.	FEBS Lett.	580 (5)	1417-24	2006
Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F.	Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection.	Proc Natl Acad Sci U S A.	102 (35)	12543-7	2005
Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells.	Biochim Biophys Acta.	1741 (1-2)	37355	2005
Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I.	Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)- associated coronavirus.	Antiviral Res.	66(2-3)	159-63	2005
Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu- Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K,	Immuno- logical detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies.	Jpn J Infect Dis.	58(2)	88-94	2005

Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T.					
Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M.	Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription.	Nucleic Acids Res.	33(6)	e65	2005
Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S.	Recombinant nucleocapsid protein- based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS.	J Virol Methods.	125 (2)	181-6	2005
Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T.	Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome- associated coronavirus infections in experimental animals.	The Nidoviruses: Towards Control of SARS and Other Nidovirus Diseases. Springer, New York			in press
Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T.	Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant.	Journal of Medical Virology	of 75	130-136	2005
Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H.	Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection.	Journal of Virology	of 79 (5)	367678	2005
Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T.	Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF.	Biochem Biophys Res Commun.			in press



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. 分担研究課題：組換え SARS-CoV 抗原を用いた IgM 捕獲 ELISA 法の開発

分担研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：昨年我々は 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 SARS 組み換えヌcleoカプシド蛋白を用いた IgG ELISA 法が、SARS コロナウイルスの安全で特異的かつ感度の高い血清診断法であること、及び SARS 診断において優れた標的抗原である切断ヌcleoカプシド蛋白が大規模な疫学研究にも利用できる可能性を持つことを報告した(*Clin Diagn Lab Immunol.* 12, 848-854)。本年度の研究では、この組み換え切断ヌcleoカプシド蛋白を抗原として用い、SARS コロナウイルス特異的 IgM 抗体検出のための IgM 捕獲 ELISA 法（MAC-ELISA 法）の開発を試みた。その結果、開発した MAC-ELISA は SARS コロナウイルスに対して 100%の特異性と感度を示し、診断にきわめて有用であることが示唆された。この方法を用いて、SARS 患者から採取した連続血清サンプルを使用することにより、SARS コロナウイルス感染後の IgM と IgG の抗体価陽転時期を測定した。その結果 IgM 検出では発症後抗体価陽転は中央値で 8 日（5～17 日の範囲）であり、また、発症後 1 週間の抗体陽性率は 33.33%、2 週間では 97.22%、3 週間では 100%であった。一方、IgG 検出では、発症後抗体価陽転は中央値で 11 日（6～21 日の範囲）であった。また、発症後 1 週間の抗体陽性率は 22.22%、2 週間は 69.44%、3 週間では 100%であった。この結果から、他の病原体と同様に SARS コロナウイルスに対しても、感染後 IgM は IgG よりも先に検出され迅速診断に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

MAC-ELISA 法は IgM を検出するために特に考案された手法であり、急性のウイルス性感染症を迅速に診断するうえで貴重な道具である。MAC-ELISA 法の capture format は外部からの抗体によって引き起こされる potential background を除去するので、結果として非特異的反応の起こる頻度が低くなり、またリウマチ因子によって引き起こされる擬陽性反応を排除する。また、抗原結合に対する IgG と IgM 間の競争を最小限にとどめられることにより、擬陰性の結果の発生を減少させる。

現在に至るまで、SARS コロナウイルスに対する MAC-ELISA 法を使った研究報告はない。本年度の研究では、平成 16 年度の研究で開発した組み換え切断 SARS コロナウイルスヌcleoカプシド蛋白を抗原として利用して、SARS コロナウイルスに対して特異的で感度の高い MAC-ELISA 法の開発を研究目的とした。またこの MAC-ELISA 法の特異性と感度を SARS 患者から採取した連続血清サンプルを用いて SARS 感染後の IgM と IgG の抗体価陽転時期を比較することで、今回開発して手法の有用性の評価を行った。

## B. 研究方法

### 1) 血清サンプル

2003年3月11日から4月3日までの間にハノイのFrench Hospital入院したSARS確定例の患者36人からの連続血清サンプルを用いた。全ての血清を使用前に30分間56°Cで加熱不活性化した。また、SARSの流行以前にハノイの健康なボランティアから採取した175人の血清サンプルを対照血清として使用した。

### 2) ELISA 抗原の調整

昨年の報告で述べた方法でSARSコロナウイルスN<sub>Δ121</sub>蛋白のヌクレオカプシド蛋白のアミノ酸を発現し精製した。N<sub>Δ121</sub>蛋白はMAC-ELISA法の抗原とともに動物の予防接種にも使用した。

### 3) 高度免疫マウス腹水の製造

生後3週間のBalb/Cマウス腹腔内に同量の完全フロイドアジュバントで乳化した100μl(100μg)の精製N<sub>Δ121</sub>蛋白を注射した(MP Biomedicals, Mernany)。その後同じものを14日間の間隔を空けて2回ブースタ投与した。最後のブースタ注射の一週間後に腹腔内に1×10<sup>6</sup>個のSP2/0骨髄腫細胞を接種してその後、産生された腹水を採取した。

### 4) Indirect IgG ELISA 法

昨年の報告で述べた方法で組み換え切断SARSコロナウイルスN<sub>Δ121</sub>蛋白を用いたIndirect IgG ELISA法を行った。

### 5) IgM 捕獲 ELISA 法

96-well Falcon immunoplates (Becton Dickinson, USA)をPBS (pH7.4)で1:250に希釈したヤギ抗ヒトIgM (BSI, USA) 100μlでコートし、一晚4°Cでplate coatingした。プレートはその後PBS-T (PBS plus 0.1% Tween 20)で5回洗浄し、分析希釈剤で1:100の割合に希釈した患者血清

サンプルを加えた。患者血清サンプルはプレート上で37°Cで1時間培養し、その後洗浄した。その後抗原(精製した組み換え切断SARSコロナウイルスN<sub>Δ121</sub>蛋白)を濃度0.2μg/ml(希釈剤中)で加え、プレートを37°Cで1時間培養した。プレートを洗浄し、1:4,000に希釈した抗SARSコロナウイルスN蛋白免疫マウス多クローン腹水(HMAF)を加え、37°Cで1時間培養した。プレートを洗浄し、1:5,000に希釈したヤギのホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (BioSource International, USA)を加え37°Cで30分間放置した。そしてwellにABTS(2,2'-azino di-ethyl-benzothiazoline-sulfonic acid)ペルオキシダーゼ基質(Kirkegaard & Perry Laboratories)を100μl加えた。暗い場所でプレートを37°Cで30分間培養し、405nmの吸光度 optical densities (OD)を測定した。

## C. 結果

### 1. 組み換え切断N蛋白を利用するSARSコロナウイルス検出MAC-ELISA法の特異性

MAC-ELISAの特異性はSARSの流行以前にハノイで175人の健康なボランティア提供者から採取しておいた血清を用いて評価した。今回新たに開発されたSARSコロナウイルスMAC-ELISA法では175全ての血清サンプルに反応が見られず、SARSコロナウイルスMAC-ELISA法の特異度は100%であった。

### 2. 組み換え切断N蛋白を利用するSARSコロナウイルス検出MAC-ELISA法の感度

MAC-ELISA法の感度を測定するために、ベトナムのSARS確定例36人から連続的に採取された150の血清サンプルについて反応性を詳しく調べた。36患者の全ての血清に今回新たに開発したMAC-ELISA法で反応性が見られた。

### 3. IgG および IgM に対する組み換えヌcleoカプシド蛋白 ELISA 法で検出された抗体陽転時期の比較

血清の連続サンプルを採取した36人の確定例の抗体陽転時期を表1に示した。IgG 検出では、発症後抗体陽転時期の中央値は11日であった(6~21日の範囲)。IgM 検出では発症後抗体陽転時期の中央値は8日であった(5~17日の範囲)。

表 1 Seroconversion time detected by indirect IgG ELISA and MAC-ELISA

Ig	Seroconversion time detected after the onset of fever		
	earliest	latest	median
IgG	6	21	11
IgM	5	17	8

### 4. N<sub>Δ121</sub> 蛋白を用いた IgG ELISA 法及び MAC-ELISA 法により発症後抗体価検出が可能になる時期

36人の確定例から採取した連続血清サンプルについて、N<sub>Δ121</sub> 蛋白を用いて IgG ELISA 法及び MAC-ELISA 法を用いて 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。その結果を表2に示す。IgG 検出では、抗 N<sub>Δ121</sub> 蛋白の IgG 陽転率は発症後1週目 22.22%、2週目に 69.44%であり、100%になったのは発症後3週目であった。一方、IgM 検出では、抗 N<sub>Δ121</sub> 蛋白の IgM 陽転率は発症後1週目 33.33%、2週目に 97.22%であり、発症後3週目に 100%になった。

(表2)

表 2 Seroconversion rate by time after onset of illness detected by N<sub>Δ121</sub> protein-based IgG ELISA and MAC-ELISA

Ig	Seroconversion rate by time after onset of illness		
	First week	Second week	Third week
IgG	22.22 %	69.44%	100%
IgM	33.33 %	97.22%	100%

### D. 結論

- 1) 組み換え SARS コロナウイルス N<sub>Δ121</sub> 蛋白は IgM を検出する SARS の血清診断に有用な遺伝子組み換え蛋白質である。
- 2) 今回開発した、組み換え SARS コロナウイルス N<sub>Δ121</sub> 蛋白を抗原として用いた SARS コロナウイルス MAC-ELISA 法は特異的で感度の高い血清診断方法である。
- 3) 抗 SARS コロナウイルス IgM 抗体は IgG 抗体よりも早く出現するので診断的価値が高い。

### E. 考察

SARS の発生以降、特異的な IgM 抗体を indirect ELISA 或いは IFA 法を用いて検出する研究が幾つか報告されている。これらの研究では、IgM 抗体は IgG 抗体より遅れて検出可能になっており、それは他の多くの病原体に関して見られる免疫反応とは逆の結果である。

IgG からの分離を伴わない Indirect-IgM 検出では擬陽性と擬陰性ともにより高くなることが知られている。したがって、これまでの研究において早期に IgG 反応が見られた理由は、SARS 感染における宿主の免疫反応の実態というよりむしろ、IgM 検出で用いた Indirect ELISA

法および IFA 検査の感度が低いことが原因である可能性が考えられた。

我々はこの疑念に答えるべく、組み換え切断 SARS コロナウイルスヌクレオカプシド蛋白を抗原として用いることにより、SARS コロナウイルス検出に用いることができる IgM 捕獲 ELISA 系を開発し、これを用いて SARS 患者の液性免疫反応を検証することとした。

これは、MAC-ELISA 法の capture format は外部からの抗体によって引き起こされる potential background を除去するので、結果として非特異的反応の起こる頻度が低くなり、またリウマチ因子によって引き起こされる擬陽性反応を排除する。MAC-ELISA 法のもうひとつの明らかな利点は、抗原結合に対する IgG と IgM 間の競争を除去することであり、それによって擬陰性の結果の発生を減少させることである。これらの点から、MAC-ELISA 法は SARS コロナウイルス検出において信頼性が高く感度の高い検出方法と考えたからである。

実験室で確認された 36 人の SARS 患者から採取した連続血清サンプルを用いて SARS コロナウイルス感染後の IgM と IgG の抗体価陽転時期を比較した結果は、IgM 抗体では陽転時期の中央値は発症後 8 日であり、発症 1 週目の陽転率は 33.33%、2 週目 97.22%、そして 3 週目に 100%であった。IgG 抗体では陽転時期の中央値は発症後 11 日であり、発症 1 週目の陽転率は 22.22%、2 週目 69.44%、そして 3 週目に 100%であった。これらの結果は SARS コロナウイルス感染後の IgM 反応が IgG 反応よりも早く現れることを示している。そしてこれは、IgM が他の多くの病原体感染においてしばしば IgG 出現の 2、3 日前に現れるという現象と一致している。

また、以上の結果および昨年の我々の報告と併せて、組み換え切断 SARS コロナウイルスヌクレオカプシド蛋白が SARS 診断の適切な標

的抗原であることを明白に示すものである。今回の  $N_{\Delta 121}$  蛋白を用いた IgG ELISA 法と MAC-ELISA 系は安全で堅固かつ高度に正確な診断法であり、それゆえ SARS 診断のみならず疾病サーベイランスや大規模な疫学調査研究、さらにはワクチンの免疫反応のモニターにも利用可能であると考えられる。

#### F. 研究発表 (論文発表)

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol.12, 848-854,2005.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。