

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

2. 分担研究課題：VSV-pseudotype による SARS-CoV 迅速中和抗体測定

分担研究者： 福士秀悦 （国立感染症研究所ウイルス第1部）

協力研究者：水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、森川茂（同上）

研究要旨：重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスである SARS コロナウイルス(SARS-CoV)は、既知のコロナウイルスとは異なる、新たに分離同定されたコロナウイルスである。このため、組換え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生きた SARS-CoV を用いるため、封じ込めができる安全な実験施設(BSL3)が必要である。そこで、われわれは SARS-CoV のスパイク糖蛋白質(S 蛋白質)を被った組換え水泡性口内炎ウイルスシュードタイプ(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。昨年度は、VSV-SARS-St19 の感染の検出法や、感染の特異性について検討を行った。本年度は、SARS-CoV 感染が確認されたヒト血清をもちいて、VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験を行い、従来のウイルスそのものを用いた中和抗体測定法との比較を行った。その結果、VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験は感度、特異性ともに優れていた。本方法は短時間で安全に中和抗体価の判定ができることから、SARS の実験室診断に有用である。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスである SARS コロナウイルス(SARS コロナウイルス)は、既知のコロナウイルスとは異なる、新たに分離同定されたコロナウイルスである。これまでの研究により、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。ウイルス中和試験には生きた 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

ガポールと北京で相次いで実験室感染事故が起きたことから、ウイルス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。昨年度は、安全な SARS-CoV 感染の血清診断法を開発を目的として、SARS-CoV の外被蛋白質(SARS-CoV-S)を被った組換え水泡性口内炎ウイルスシュードタイプ(VSV-SARS-St19)を作製した。VSV-SARS-St19 は一回のみ細胞へ感染可能なので生物学的封じ込めの観点から安全性が高い。また、抗 SARS-CoV ウサギ血清などを用いた検討から、VSV-SARS-St19 感染の特異性は生きた SARS-CoV そのものと同様であるという知

見をすでに得ている。本年度は、SARS-CoV 感染が確認されたヒト血清をもちいて、VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験を行い、従来のウイルスそのものを用いた中和抗体測定法との比較を行った。

B. 研究方法

1) VSV-SARS-St19 の作製

VSV Δ G*-G (VSV-G 遺伝子の代わりに GFP 遺伝子を組み込んである) を、SARS-CoV-S タンパク質を発現する 293T 細胞へ接種。24 時間後に培養上清中の VSV-SARS-St19 を回収した (図 1)。

2) ヒト血清サンプル

2003 年 3-4 月 (SARS アウトブレイク時) 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 (Saijo et al., J. Virol. Methods, 2005)。

3) VSV シュードタイプ中和試験

VSV-SARS-St19 と段階希釈した血清サンプルを混和し、37°C、1 時間反応後、その混和液を Vero E6 細胞に接種。VSV-SARS-St19 感染細胞 (GFP 発現細胞) を蛍光顕微鏡下で写真撮影し、ImageJ software を用いて GFP 発現細胞をカウントした。血清非添加の場合をコントロール (100%) として感染効率を算出した。

(倫理面への配慮：ヒト検体の使用に当っては、倫理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

2003 年 3-4 月 (SARS アウトブレイク時) にベトナム Hanoi French Hospital の health care worker から採取された 56 血清サン

ルのうち、同一患者から経時的に採取された 4 サンプルを用いて、VSV-SARS-St19 感染の中和試験を行った (図 2)。2003 年 3 月 17 日に採取された血清サンプルは 80 倍希釈でも VSV-SARS-St19 の感染を阻害しないのに対し、3 月 26 日に採取された血清サンプルは 80 倍希釈で VSV-SARS-St19 の感染を 50% 以上阻害した。それ以降 (3 月 29 日および 4 月 8 日) に採取された 2 つの血清サンプルは、1,280 倍希釈でも 50% 以上の阻害効果を示した。これらの結果から、この患者血清中の VSV-SARS-St19 に対する中和抗体価が 3 月 26 日以降に上昇したことが明らかになった。50% 以上の感染阻害効果を示す最小の血清希釈倍率を中和抗体価としたとき、3 月 26 日、3 月 29 日および 4 月 8 日に採取された血清中の中和抗体価はそれぞれ 80, 1,280, 1,280 であった。また、他のペア血清を用いた中和試験でも同様に VSV-SARS-St19 に対する有意な中和抗体価の上昇が認められた (データは示さず)。

VSV-SARS-St19 を用いることにより SARS-CoV に対する中和抗体測定が可能であると考えられたため、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 を使った場合の中和試験は SARS-CoV そのものを使った中和試験に比べて感度 97%、特異性 86% であった (表 1)。さらに VSV-SARS-St19 に対する中和抗体価と SARS-CoV そのものに対する中和抗体価には正の相関が認められた (図 3)。中和抗体価は VSV-SARS-St19 を使った場合の方が高い傾向がみられた。さらに、SARS-CoV そのものを使った試験で中和抗体陰性で、VSV-SARS-St19 を使った試験では中和抗体陽性あった 3 サンプルのうち、1 サンプルは組み換え NP 蛋白質を抗原とした ELISA では陽性反応を示していた (データは示さず)。これらの結果から、VSV-SARS-St19 を用いた中和試験は

SARS-CoV に対する中和抗体を高感度に検出できると考えられた。

D. 結論

- 1) 本研究で開発した VSV-SARS-St19 を用いることにより SARS-CoV に対する中和抗体を測定できた。
- 2) VSV-SARS-St19 による中和試験は SARS-CoV そのものを用いた中和試験の結果高い相関を示した。

E. 考察

本研究で開発した非増殖性組み換えウイルスである VSV-SARS-St19 の中和抗体測定ツールとしての実用性を検討した。VSV-SARS-St19 による中和抗体測定は SARS-CoV そのものを用いた測定結果と良く相関することが分かった。本方法は短時間で安全に中和抗体価の測定が出来ることから、SARS の血清学的診断に有用であると考えられた。今後は、多検体を同時に処理する方法について検討する予定である。

E. 研究発表

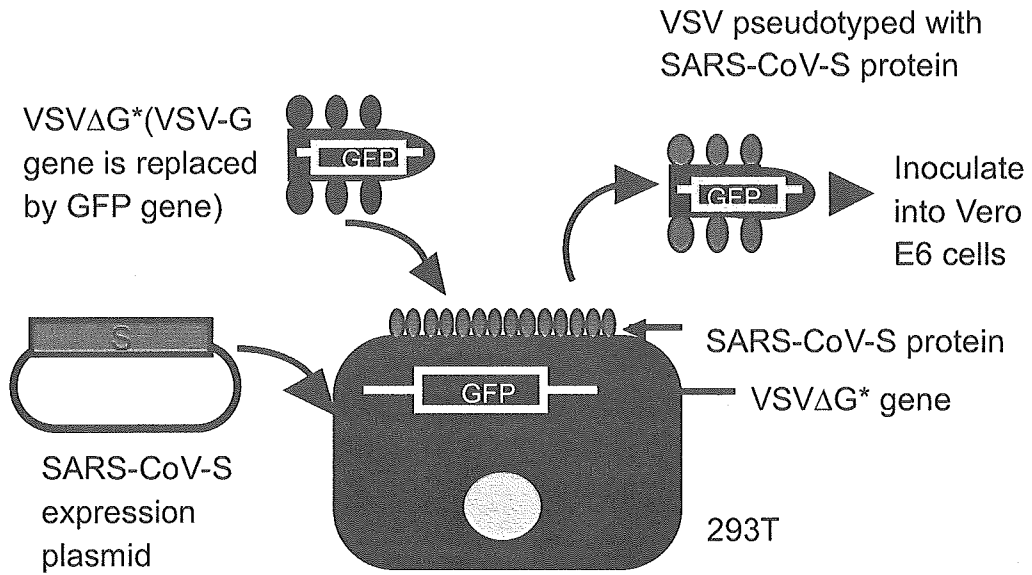
論文発表:

Fukushi, S., T. Mizutani, M. Saijo, S. Matsuyama, N. Miyajima, F. Taguchi, S. Itamura, I. Kurane, and S. Morikawa. 2005. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol* **86**:2269-2274.

F. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1. VSV-SARS-St19の作製



(Fukushi *et al.*, J. Gen. Virol., 2005)

図2. VSV-SARS-St19を用いた中和試験

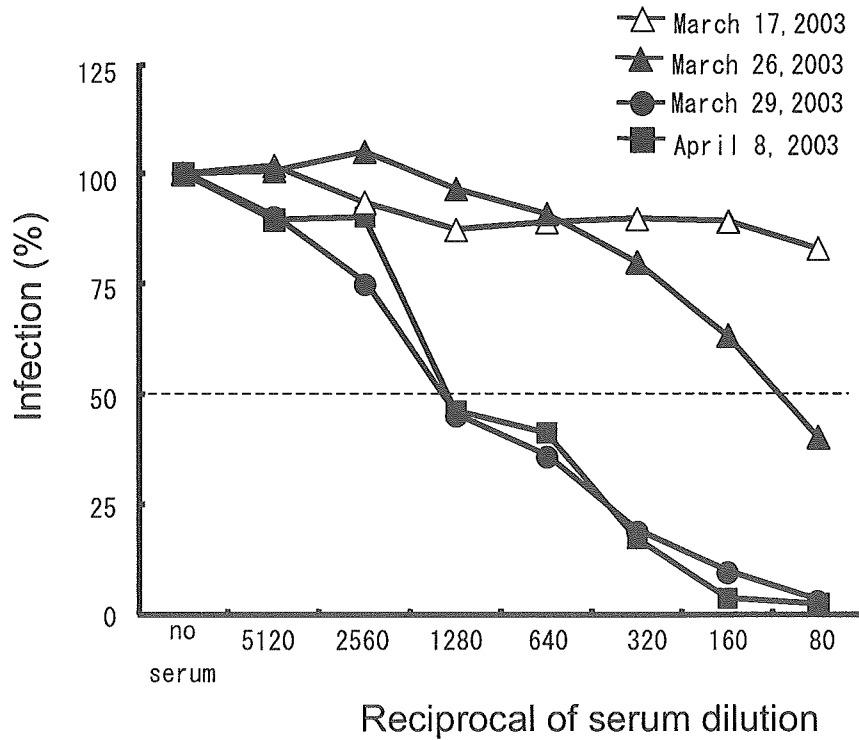
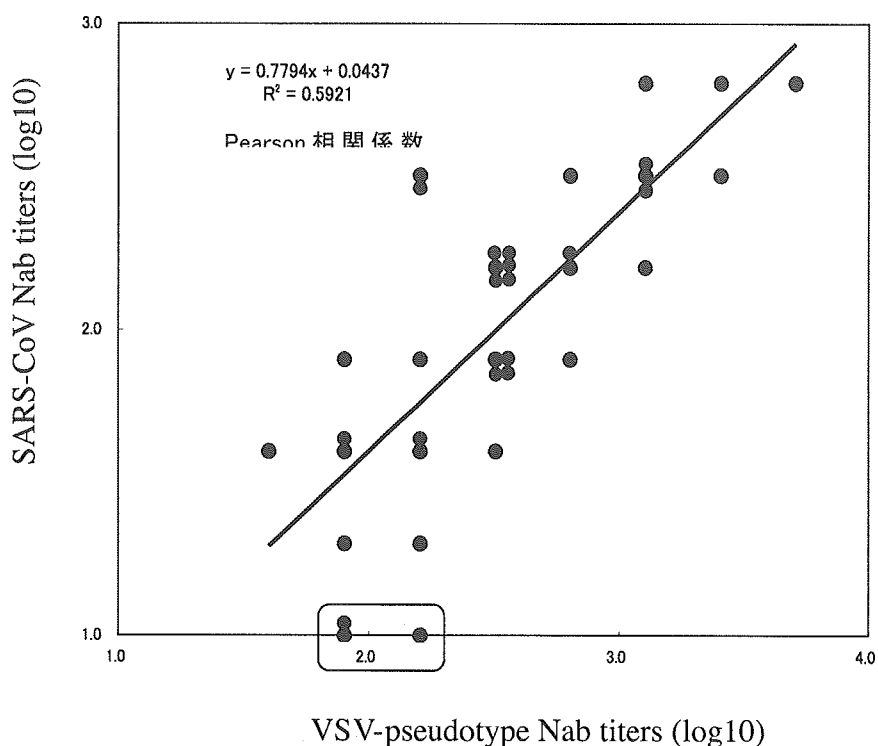


図3. VSV-SARS-St19を用いた中和試験



Correlation between neutralizing antibody titers measured by using VSV-SARS-St19 pseudotype and those measured by using SARS-CoV. The correlation coefficient was 0.77.

表1. VSV-SARS-St19とSARS-COVを用いた中和試験の比較

SARS-CoV	VSV-SARS-S pseudotype		Total
	Positive	Negative	
Positive	33	1	34
Negative	3 ^a	19	22
Total	36	20	56

Comparison of the results of the neutralization assay using VSV-SARS-St19 pseudotype with those using SARS-CoV.

^aOne serum sample was positive in the rNP-based ELISA.

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

3. 分担研究課題：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）のスパイク蛋白質を表面に被ったシュードタイプバキュロウイルスを作製し、レセプターである 2 型アンギオテンシン転換酵素（ACE2）発現細胞への遺伝子導入を試みた。

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疱性口内炎ウイルスで開発されている。本研究においても昨年度、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、SARS-CoV スパイク蛋白質を発現する細胞への感染特異性を報告してきた。今年度は SARS-CoV のスパイク蛋白質を被ったシュードタイプバキュロウイルスの作製を試み、その感染特異性を検討した。

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 SARS-CoV スパイク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する（図 1）。

これまでにレトロウイルスを用いた SARS-CoV シュードタイプウイルスの作製において、スパイク蛋白質の cytoplasmic domain が適切な長さでなければ効率よくウイルスに取り込めず、そのため感染性が得られないという報告がある。また我々もこれまでに麻疹ウイルスのレセプターの一つである SLAM 蛋白質を被ったシュードタイプバキュロウイルス作製において、全長遺伝子を発現させた SLAM ではウイルスの取り込み効率が悪く、

cytoplasmic domain を一部欠損させた SLAM では効率よくバキュロウイルスに被らせることを明らかにしている。

そのため、本研究においても SARS-CoV スパイク蛋白質の cytoplasmic domain を短くしたコンストラクトを同時に作製し、組換えウイルスゲノムを作製した。この組換えゲノム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 SARS-CoV スパイク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。

（倫理面への配慮：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. 研究結果

SARS-S の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 SARS-S が発現されることを確認した。また、cytoplasmic domain を一部欠損させた SARS-Scyto7 でも同等量発現されることが確認できた。その培養上清中より回収した SARS-S シュードタイプウイルス（AcΔ64/SARS-S/CAluc および AcΔ64/Scyto7/CAluc）からは、SARS-S が検出され、SARS-S 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（図 2）。

この SARS-S 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 のレセプターである 2 型アンギオテンシン転換酵素 (ACE2) を発現させた細胞 (293T および BHK) では感染性が見られなかった。

D. 考察

シュードタイプバキュロウイルスにおいてはレトロウイルスや水疱性口内炎ウイルスで見られるような cytoplasmic domain を短く欠損させても SARS-S の取り込み効率に差異は見られなかった。しかしながら SARS-S はシュードタイプバキュロウイルスに取り込まれているもののレセプターを強制発現させたような細胞においても感染性が見られなかった。これは質的な問題なのかもしくは量的な問題なのかは現在のところ明らかになっていないが、細胞への侵入には機能的に働かないことが示唆された。今後このシュードタイプウイルスにおいては質的もしくは量的な改善が必要であると思われる。

F. 結論

1. SARS-S 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. 昆虫細胞で作製された SARS-S シュードタイプバキュロウイルスは ACE2 発現細胞への感染性を示さなかった。

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).

2. 学会発表

特になし。

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

図 1. SARS-Sシュードタイプウイルスの作製法

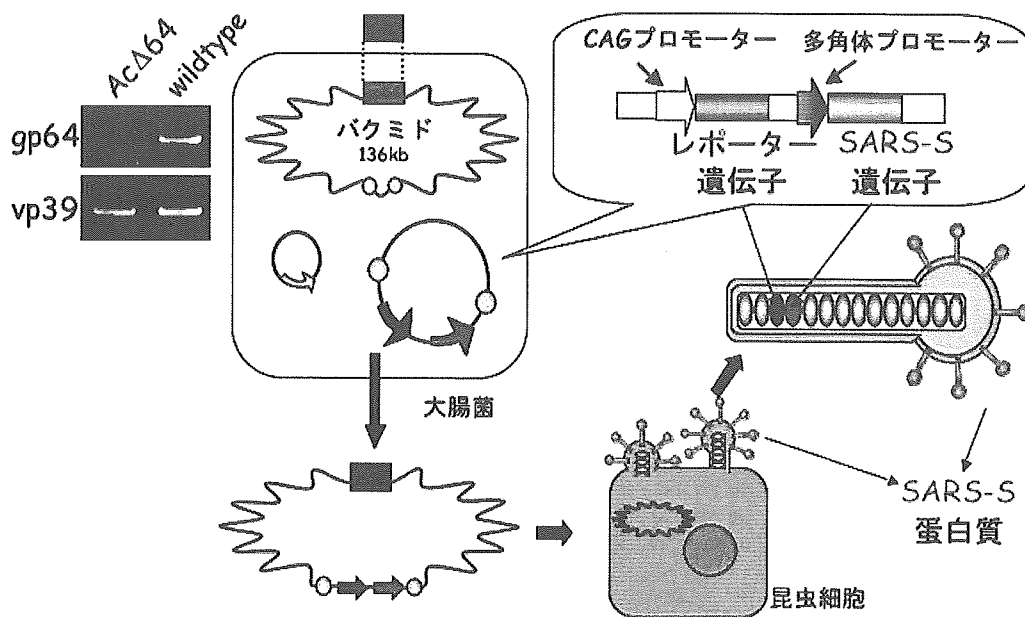
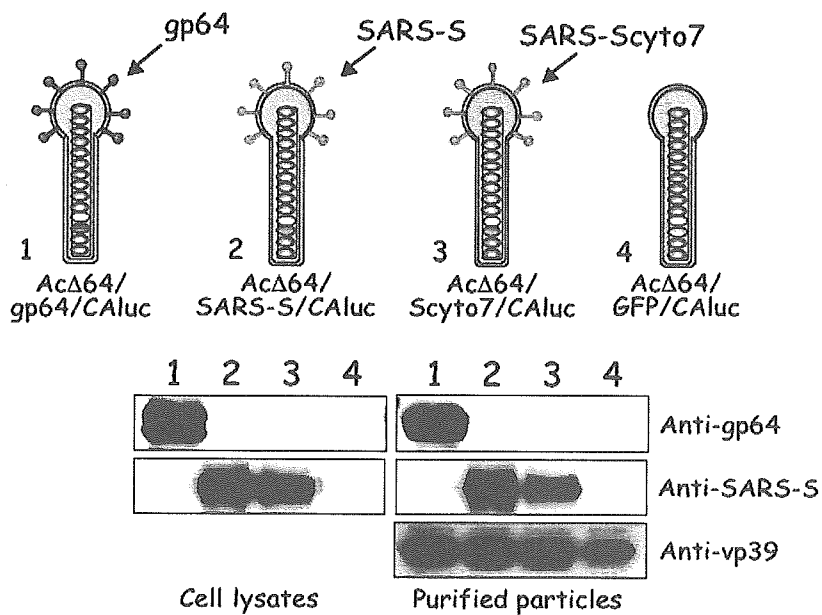


図 2. SARS-Sシュードタイプウイルスの性状



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

分担研究課題：SARS コロナウイルスの迅速抗原検出キットの開発

分担研究者： 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所副所長兼感染症部長
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主任研究員
岡田全司 国立療養所近畿中央病院臨床研究センター長
生田和良 大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨：SARS コロナウイルス（SARS-CoV）をマウスに免疫し、4種類のモノクローナル抗体を得た。これらはすべて、S蛋白に対する抗体であることをウエスタンブロット法で同定した。イムクロマト法を開発するため、これら抗体を組み合わせて Sandwich ELISA を行った。ヘテロの抗体の組の合せで強い反応性を認め、イムクロマト法に応用できる可能性があることを明らかにした。

A. 研究目的

呼吸器感染症や腸管感染症を起こす病原体を特定することは困難であったが、イムクロマト法が導入されて以降、患者を診察中に確定診断することが可能となった。今や第一線の医療機関においては、これを応用した迅速診断キットは必需品となっている。

今回、SARS 患者を外来受診中に診断する目的で、イムクロマト法を応用した迅速診断キットの開発を行った。SARS-CoV をマウスに免疫し、数種類のモノクローナル抗体を得たので、SARS-CoV 抗原に対する反応性を ELISA で調べた。次いで、これら抗体をイムクロマト法に導入し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

ウイルスと細胞：SARS コロナウイルス FFM-1 株を実験に用いた。抗原液の作製、中和試験のため Vero E6 細胞を用いた。

抗体：6種類の抗体を実験に供した。TW1E はE蛋白のペプチドをウサギに免疫して作

製した抗ペプチドポリクローナル抗体である。D4、2G3、3A2、3E3の4種類は、FFM-1株をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体である。2E3B5は、市販品のS蛋白に対するマウスモノクローナル抗体である。

SARS 抗原液の作製：抗原液の作製は、全て BSL3 レベルの施設で行った。抗原液 (A) は、SARS コロナウイルス FFM-1 株を Vero E6 細胞に接種、次いで 24 時間後に培養上清を回収し、2,000rpm で遠心した後の上清を使用した。抗原液 (B) は、感染細胞を Cell lysis buffer に溶かし、10,000rpm で遠心後、上清を回収したものを使用した。両抗原とも、Vero E6 細胞に接種し、感染性を否定した。

抗体の認識蛋白：各抗体の認識蛋白を確認するため、不活化ウイルス抗原(B)を電気泳動 (SDS-PAGE) 後、メンブレン転写し各抗体を反応させ抗体の認識蛋白をウエスタンブロット法にて確認した。

Indirect-ELISA：96 穴 ELISA プレートに 10 μ g/well (炭酸バッファー、pH9.6) の

量で不活化抗原 (B) をコートし、4°Cで16時間放置した。洗浄後、イムノブロックで37°C、2時間ブロッキングを行った。洗浄後、20、5、1.25、0.31、0.08、0.02 μ g/mlに希釈した各抗体を100 μ l/wellの量で37°C、1時間反応させた後、洗浄し4,000倍希釈した抗マウス (D4、2G3、3A2、3E3、2E3B5の場合) または抗ウサギ IgG (TW1Eの場合) HRP 標識抗体 (100 μ l/well) を37°C、1時間反応させた。洗浄後、100 μ lのTMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)反応液を各wellに加え、室温で10分放置した後、100 μ lの1M H_3PO_4 を添加して反応を停止し、415nmでの吸光度を測定した。

Sandwich ELISA : 96穴ELISAプレートに2 μ g/well (炭酸バッファー、pH9.6)の量で各抗体をコートし、4°Cで16時間放置した。洗浄後、イムノブロックで37°C、2時間ブロッキングを行った。洗浄後、1mg/ml、0.1mg/mlの不活化抗原 (B) とコントロールとして細胞溶解液を100 μ l/wellの量で37°C、1時間反応させ、洗浄後にビオチン化した各抗体 (3 μ g/ml) を100 μ l/wellの量で37°C、1時間反応させた。洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン (100 μ l/well) と室温で30分反応させた。洗浄後、100 μ lのTMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)反応液を各wellに加え、室温で10分放置した後、100 μ lの1M H_3PO_4 を添加して反応を停止し、415nmでの吸光度を測定した。

中和試験 : 20 μ g/mlの抗体と18TCID₅₀のウイルス液を1:1で混合し、37°Cで30分中和させた。残存ウイルス液をVero E6細胞に感染させ、48時間培養した。培養後、細胞をホルマリン固定し、アミドブラック10Bで染色した。

イムノクロマト法 : Hi-Flow135ろ紙 (ミリポア) に2mg/ml (5mM ホウ酸緩衝液)の濃度の抗体 (D4、3A2) をスポットしハーフストリップろ紙を作製した。同じ抗体を用い、金コロイド標識抗体も作製した。ウイルス抗原液 (A、B 両方使用) と金コロイド標識抗体をマイクロチューブ内で反

応させた。そこにハーフストリップろ紙の先端を浸漬し、10分後に判定した。

C. 研究結果

(1) 抗体の性状

実験に用いた抗体の性状を表1に示した。ウエスタンブロット法にて抗体が認識する蛋白を同定した (図1)。2G3、3A2、3E3、D4はS蛋白を認識したが、この方法ではTW1EがE蛋白を認識することは証明できなかった (3E3のデータは示されていない)。2G3、3A2、3E3は中和活性を有していた。

(2) Indirect-ELISA

Indirect-ELISAにより各抗体のウイルス抗原に対する反応性を調べた (図2)。3E3、3A2のELISA価は非常に高かったが、2G3、D4、2E3B5のそれは、陽性ではあるが極めて低かった。TW1Eは、ほとんど反応しなかった。

(3) Sandwich ELISA

2G3、3E3、3A2、D4の4種類の抗体をコーティングに使い、2G3、3A2、D4をビオチン化してSandwich ELISAを行った (図3)。ホモの組み合わせでは反応性は弱かったが、ヘテロの場合、どの組み合わせでも強い反応性が観察された。

(4) イムノクロマト法

これら抗体をイムノクロマト法に応用するため、まずコーティングの抗体として3A2、ビオチン化の抗体としてD4を用いて試験した。目的の位置にバンドは形成されたが、PBSやsample bufferだけでも非特異的なバンドが形成され、特異バンドとの区別が困難であった。

D. 考察

精度の高いイムノクロマト法を開発するには、使用する抗体の感度と特異性が決定的に重要である。今年度はSARS-CoVをマウスに免疫し、得られたモノクローナル抗体の有用性をELISAで検討した。

昨年度の研究において、SARS-CoVのE蛋白を認識すると思われるウサギの抗ペ

チド抗体 (TW1E) を得たので、今年度の研究においても実験に供した。しかし、Indirect-ELISA では反応性がほとんど認められず、イムノクロマト法に使用するのには困難と思われた。E 蛋白の分子量は極めて小さく、ウイルスの蛋白含量に占める割合も小さいので、E 蛋白に対する抗体はイムノクロマト法には不適である。

今回、マウスから得られたモノクローナル抗体は、すべて S 蛋白に対するもので、これは S 蛋白の強い免疫原性を反映しているものと考えられた。モノクローナル抗体の反応性を Indirect-ELISA で調べると、強く反応するもの (3E3、3A2) と弱い反応しか示さないもの (2G3、D4、2E3B5) の大きく 2 群に分かれた (図 2)。しかし、Sandwich ELISA では、どのヘテロの組み合わせでも強い反応性が見られた (図 3)。これらヘテロの組み合わせにより、高感度のイムノクロマト法の開発が可能と考えた。尚、市販の 2E3B5 は高価であるため、Sandwich ELISA に使うことはできなかった。

1 つの抗体の組み合わせをイムノクロマト法に応用し、SARS-CoV 抗原の検出を試みた。しかし、バッファーだけでも抗体を塗布した場所にバンドが形成された。この非特異的の反応を除去することが今後は課題で、そのためには検体処理液の調整が重要と考えられた。

E. 結論

SARS-CoV をマウスに免疫して 4 種類のモノクローナル抗体を得た。これら抗体の反応性を ELISA で調べ、ヘテロの抗体の組合せで高い反応性を示すことが確認できた。来年度は、これら抗体を用いたイムノクロマト法を開発する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Okada, M., Takemoto, Y., Okuno, Y., Hashimoto, S., Yoshida, S. et al. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. Vaccine 23:2269-2272. 2005.

2. 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

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 1. SARS-CoV-1 に対する抗体

クローン名	由来種	認識蛋白	中和活性	モノクローナル抗体 / ホリクローナル抗体
TW1E	Rabbit	E蛋白	-	抗ハ ⁺ フ ⁺ チ ⁺ ホ ⁺ リクローナル抗体
D4	Mouse	S蛋白	-	モノクローナル抗体
2G3	Mouse	S蛋白	+	モノクローナル抗体
3A2	Mouse	S蛋白	+	モノクローナル抗体
3E3	Mouse	S蛋白	+	モノクローナル抗体
2E3B5	Mouse	S蛋白	-	モノクローナル抗体 (市販品)

図1. ウェスタンブロット法による抗体の認識蛋白の同定

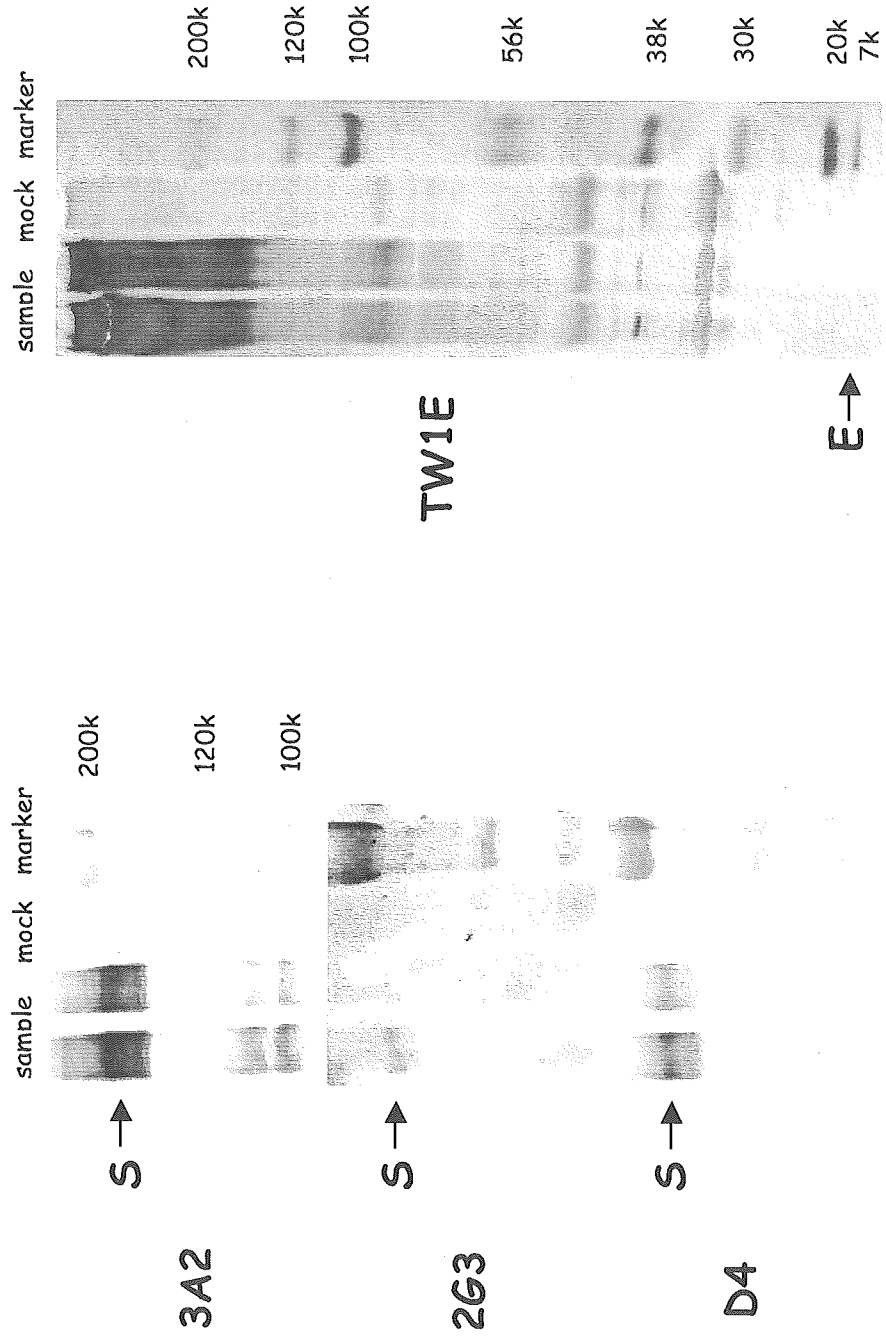


図2. Indirect-ELISA による抗体の反応性

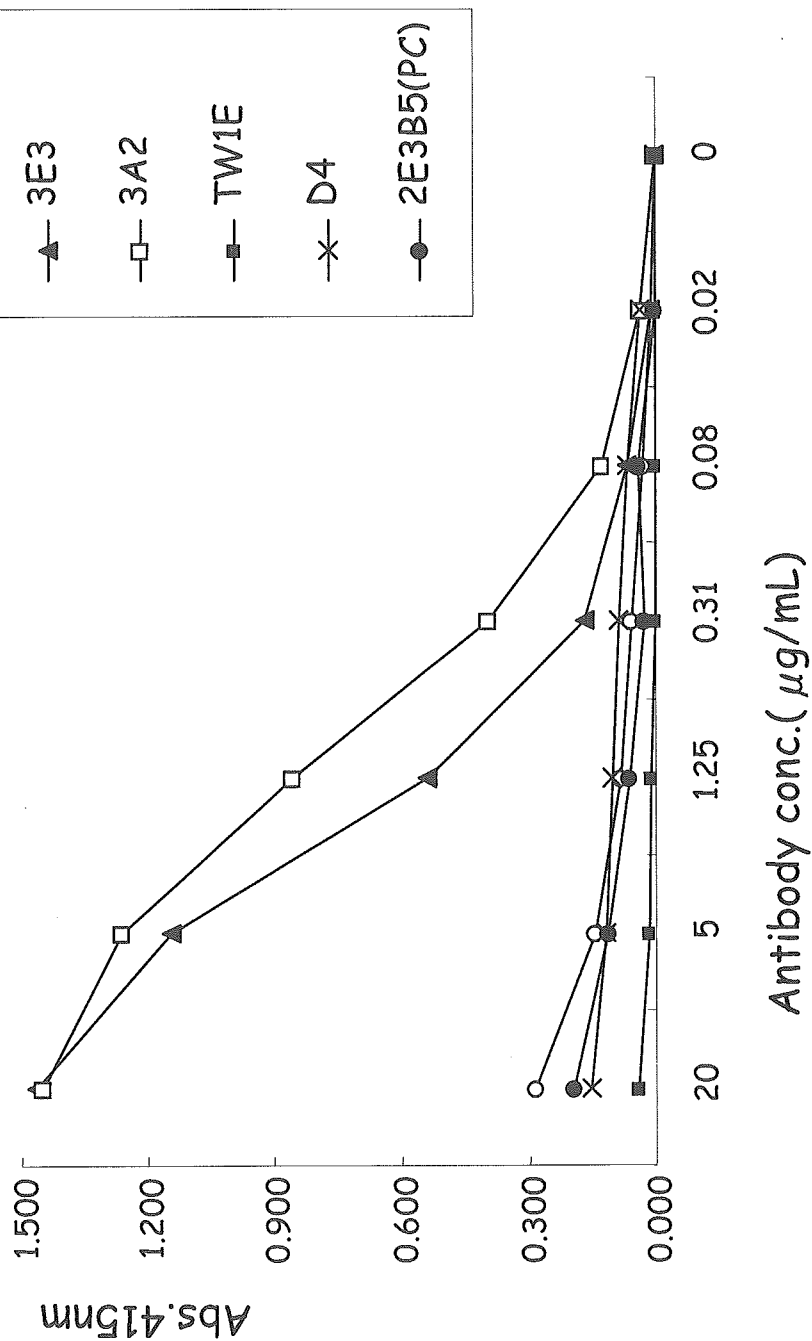
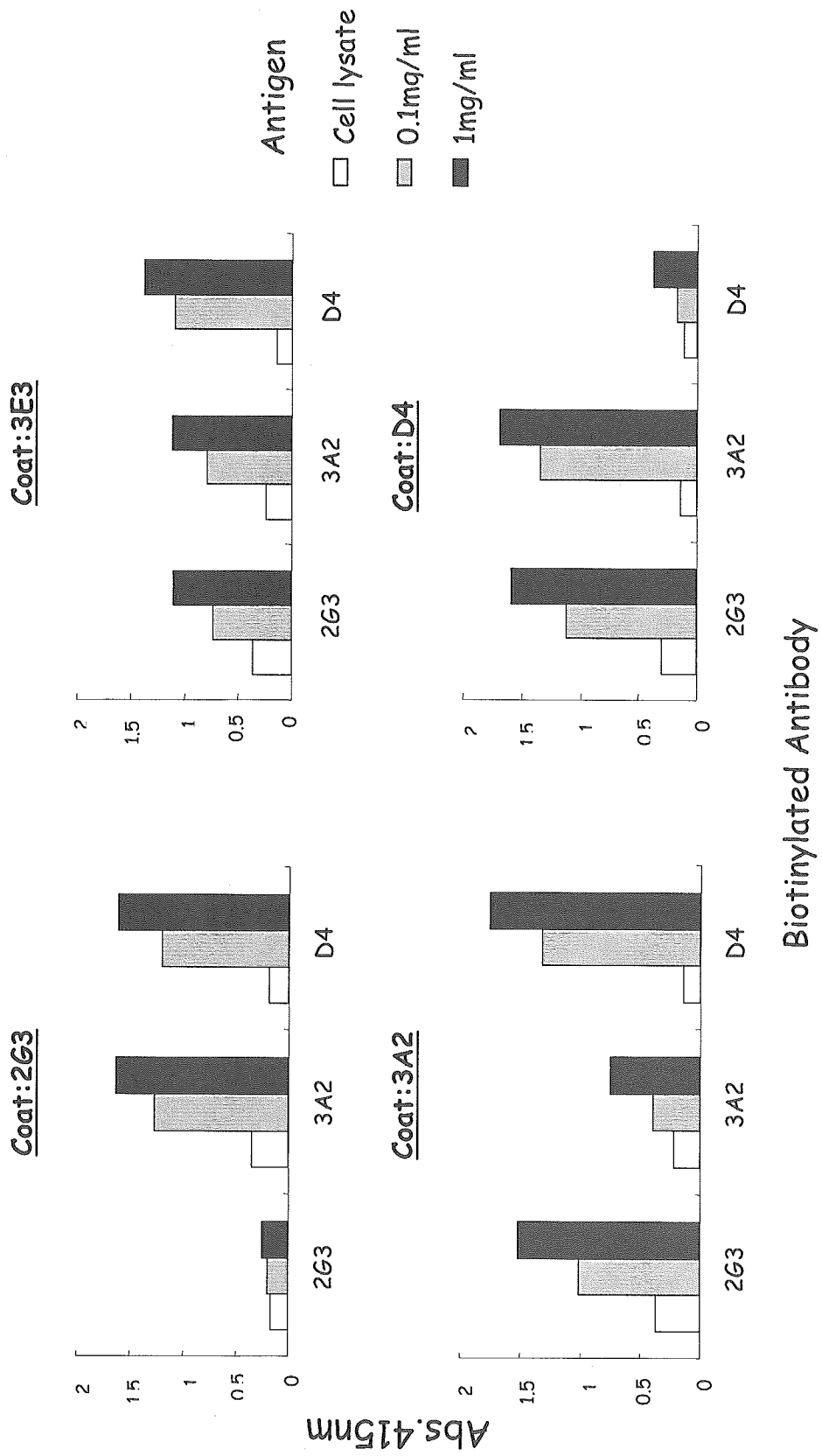


図3. Sandwich ELISA による抗体の反応性



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

5. 分担研究課題：SARS / RT-LAMP 検出試薬開発と臨床評価

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス第 3 部 部長

研究要旨 これまでに、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 (LAMP 法) の開発・実用化に成功したが、更に感度を上げることと、操作 (特に RNA 抽出過程) の簡便化を検討した。

研究背景

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 コロナウイルスの自然宿主はコウモリであるとの報告がなされてはいるものの、その起源は依然不明であり、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。特に、H5N1 型鳥インフルエンザウイルスの流行が拡大しつつあり、ヒト感染例では、臨床症状と病態は SARS と酷似している。

現在のところ、通常のインフルエンザに

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。また、H5N1 型鳥インフルエンザ感染患者については、上気道検体を用いた検査での陽性率はゼロに近く、従来の迅速診断キットの有用性は低いと評価されている。

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。

この様な状況から、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。

そこで、昨年度までに、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。

A. 研究目的

SARS の早期診断を簡便に行うという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。

特に、本年度は臨床検体からの 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。

B. 研究方法

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、平成 15 年 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した。

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。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た。

[治験試薬および対照試薬]

1. 治験試薬：SARS/RT-PCR 検出試薬
2. 対照試薬：
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
香港特别行政区衛生部ウイルス部
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。

[測定検体]

1. 国立感染症研究所

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. 香港中文大学

血清(血漿)、咽頭・鼻腔拭い液、糞便

3. 香港特别行政区政府衛生署

血清

[RNA 抽出方法]

市販の各種 RNA 抽出キットおよび自家製のカラムを用いて、操作条件を変えて RNA 抽出・精製を行った。

C. 結果 および D. 考察

1. 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 を行っている。これは測定所要時間が 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。

しかし、感度を更に高める可能性があるために、この 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。

2. 香港特别行政区政府衛生署において、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。その結果、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。

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。

E. 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、香港特别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。

RNA 抽出方法の違いは、LAMP 法の結果に大きな影響を与える物ではないことが分かった。

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、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、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。

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。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

論文発表

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* 125, 181-186, 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

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.* 58;88-94, 2005

Matsuyama, S., Taguchi, F., Tashiro, M.: Protease-Mediated Enhancement of SARS Coronavirus Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:12543-12547, 2005

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

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

6. 分担研究課題：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 副所長

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、本年度は下記の 3 点について検討を行った。

1. 前年度に設計した現行開発済みとは別領域の 3 つのプライマーセットについて感度比較を行ったところ、現在開発済みセット以上の成績は得られなかった。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本年度は 10 種見出した。前年度分と合わせ 17 種について、まず現行酵素と感度比較を行ったが特に感度が向上するものはなかった。しかしラクトフェリンとヘパリンの阻害の影響が小さいものが 1 種みつかった。3. LAMP 反応溶液に RNase inhibitor を添加しておくことで、唾液中の RNase の影響抑制に有効であることが判明した。

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 が临床上疑われた場合、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
前年度より引き続きプライマーの改良検討を行った。現在開発済みのプライマーは、SARS-CoV ゲノムの塩基配列番号 18000 近辺の領域に設定してあるが、感度向上を目的として別領域中を心にプライマー設計し、感度比較を行った。

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、逆転写酵素を広くスクリーニングを行い、本年度は新たに 20 種類の酵素についてスクリーニングを実施した。

3. RNase inhibitor の効果

RNA を特に高感度に検出する場合、微量の RNase の影響により検出感度が低下する恐れがある。そこで RNase の影響を抑制するために RT-LAMP 系に RNase inhibitor の添加が有効であるかどうか検討した。

(倫理面への配慮：該当しない)

C. 研究結果