

厚生労働科学研究費補助金
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
(H16-新興-12)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 伊東 恭悟

平成18年(2006)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:
SARS患者血清中抗体が認識するペプチドの同定

1-5 伊東恭悟

II. 分担研究報告

1. SARSイムノクロマト簡易診断試作品の評価およびHLA拘束性SARS-CoV由来ペプチドの設計

6-9 笹月健彦

2. SARS簡易診断のためのイムノクロマト試作品の開発およびHLA拘束性T細胞エピトープの同定

10-13 七條茂樹

3. SARSイムノクロマト簡易診断試作品の評価およびHLA拘束性T細胞エピトープの同定

14-17 切替照雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

なし

IV. 研究成果の刊行物・別冊

なし

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)(1) 昨年度の本研究で患者に長期間免疫応答が持続する抗体により認識されるSARSウイルスの構造蛋白由来エピトープペプチドを同定し、それらを用いた迅速診断法を確立する。(2) HLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドに対する抗体を1年目と同様な方法で測定し、抗体により認識されるT細胞エピトープペプチドを同定する。これらのペプチドを用いて健康人末梢血からのT細胞誘導能を調べ、SARSの治療ワクチンの開発及び病因解明のための情報を得る。(結果)(1) 42種類のペプチドのうち感染6ヶ月後患者血清で有意に認識される3種類(S791, M207, N161)のペプチドを用いたイムノクロマト簡易型診断キットを作成するために、ペプチドのマトリックスへの結合様式の検討などの基礎研究を行い、S791に対して約70%の感染者で抗体を検出できるキットの開発を行った。(2) T細胞エピトープペプチドに対する抗体産生の意義は、癌ペプチドワクチンの臨床研究の過程で明らかになった。そこで、治療を念頭に感染者血清中抗体によるスクリーニングを行い、感染患者の液性免疫系に認識されるT細胞エピトープの同定を行った。SARS感染急性期患者は日本では発生していないので、本研究では健康人における交差反応性T細胞の存在を確認すること、およびそのT細胞の存在意義の解析を目的として、健康人T細胞でのCTL誘導実験を行った。(考察)イムノクロマト法は設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。また、T細胞エピトープの同定は、これらのペプチドによる診断的価値、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性が得られるものと考えられる。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

A. 研究目的

(1) 1年目の本研究で同定した患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体により認識されるSevere Acute Respiratory Syndrome (SARS)ウイルスの構造蛋白エピトープペプチドを用いた迅速診断法を確立する。この方法により、設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。(2) HLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドに対する抗体を、1年目と同様な方法で測定し、抗体により認識されるT細胞エピトープペプチドを同定する。このペプチドによる診断的価値、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性について検討する。

B. 研究方法

血清収集、管理

SARS感染患者血清; 感染初期に3名の台湾人より採血した血清はJen-Ai Municipal Hospital (SaAn

District, Taipei, Taiwan)より供与された(担当:伊東、笹月)。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より供与された(担当:切替、笹月)。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供与された(担当: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(担当:切替)。

ペプチド(担当:伊東、笹月)

イムノクロマトのためのペプチド3種類(S791, M207, N161)は90%以上の純度で、またSARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド(HLA-A2およびA24拘束性)由来の9~10merペプチドをそれぞれ227および113種類(合計340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、特異性などの確認および健常人末梢血からのCTL誘導実験を行った。

ウサギ抗ペプチド抗体の作成(担当:七條、伊東)

ペプチドに対する抗体を作成する目的で、昨年同定した3種類のペプチド(N161, M207, S791)をそれぞれKLH(キャリアータンパク:Imject Immunogen EDC Conjugation Kit with mckLH, Rockford, IL)に結合させた。すなわち、①2mg mckLHを200・lの脱イオン水に溶かす。②2mgのペプチドをConjugation Buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, 0.02% NaN₃, pH4.7)に溶かす。③500・lのペプチド溶液を200・gキャリアータンパク溶液に加える。④EDC 1vialを1mlの脱イオン水に溶かし、この溶液50・lをキャリアー・ペプチド溶液に直ちに加える。⑤室温で2時間静置する。⑥透析により、NaN₃およびConjugation Bufferを除く。⑦280nmにおける吸光度を測定してペプチド-KLH複合体の濃度を定める。また、ウサギへの免疫は、①MPL + TDM Emulsion, R700 [アジュバント:RIBI Adjuvant system (RAS)(RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)]に、KLH(キャリアータンパク)ーペプチド複合体溶液を2ml入れ、37°C恒温槽で暖めて乳濁液を作成する。②100・lずつ、背中6カ所に毎週、10回以上皮内注射する。③免疫ウサギ耳朶より抗体測定のために採血する。

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°Cで保存した。

ペプチドのcolor-coded beadsへの結合: 100・l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。
- 3) 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って採血して研究に供している。

C. 研究結果

イムノクロマト法による抗体の簡易検出

昨年同定した3種類のペプチド(N161, M207, S791)のうちS791を用いたイムノクロマトによる簡易診断法の開発を試みた。開発にはウサギ抗血清を作成して用いた。3種類のペプチドをそれぞれ2羽ずつのウサギに免疫し、ルミネックスを用いたフローメトリー法で抗体価の測定を行った。N161およびM207に対しては高力価の抗血清が得られなかった。そこで最も力価が高いウサギ抗S791抗血清を用いて以下の実験を行った。ペプチドのN-末端及びC-末端を介してアルブミンに結合させた複合体をイムノクロマト担体に固相化したチャンバーでの反応性をウサギ抗血清を用いて調べたところ、後者(C-末端)の方が前者(N-末端)に比べて感度が高いことがわかった。この結果はルミネックス法でS791に対する抗体が陽性だった感染初期の27検体の患者血清でも確認された。すなわちC-末端結合法で20例(74%)が陽性だったのに対し、N-末端結合法では8例(30%)と検出率が低かった。

MHC拘束性エピトープの同定

SARSウイルス遺伝子がコードするタンパク由来9~10残基のアミノ酸からなるHLA-A2あるいは-A24拘束性ペプチドをそれぞれ227および113(合計340)種類を3名の急性期感染患者血清、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スクリーニングしたところ、12種類のペプチドが陽性であった。Replicase, RNA-directed RNA polymerase が5(A2:

#21, #74, #80, #119, #125)及び6 (A24: #250, #281, #287, #295, #310)、合計11、spike (S)がA2 (:#174)、および putative uncharacterized protein 2がA2拘束性1種類(#201)で、その他のコード遺伝子産物の陽性ペプチドはなかった。これらのペプチドのうち健常人および接触非感染者血清では検出されなかったGroup2(#125, #310)、健常人血清でも検出されるが患者と比較すると弱いGroup3(#80, #119, #201, #287)、両者ともに強く反応するGroup4(#21, #74, #174, #250, #281, #295)、および健常人及びSARS患者いずれも陰性のGroup1コントロールとしてRNA-directed RNA polymerase 由来の#289及びspike (S)由来A24拘束性の#328を選んだ。

CTL誘導

健常人及び感染者血清中抗体で選別した12種類と対照2種類(合計14種類)のペプチドに対して、健常人(5人)末梢血からT細胞誘導能を有するペプチドを10種類(#21, #74, #80, #250, #281, #287, #289, #295, #310)同定した。五人中一人でも誘導された場合を陽性と判定した。#289は、抗体により検出されなかった陰性コントロールとしてT細胞誘導実験を行ったが、5人中3人で誘導された。このことは、抗体の存在が、T細胞誘導にとって必ずしも必要十分条件ではないことを示している。

D. 考察

昨年度の本研究で、Luminexを用いたflowmetry法により長期持続免疫抗体が認識するSARS-CoV構造蛋白質由来エピトープペプチド3種類を同定した。SARSウイルスに対するIgG抗体は中和抗体とよく相関し、4ヶ月をピークにその後減少する。そして、16ヶ月くらいまではすべての患者で検出され、24ヶ月で約12%の患者が検出できなくなる(Liu W et al, J Infect Dis, 193. 792-5, 2006)といわれている。本研究ではこれらのペプチドを用いてイムノクロマトによる迅速診断法の開発を行った。この方法は特殊な設備や機器がない場所でも、すばやく簡単に測定できるというメリットがあることから、インフルエンザ抗原の検査に用いられている。開発に当たっての問題点として、1. 幸いにもSARS患者が日本で発生せず、したがって診断法の開発をするための抗体を如何に得るか、2. 抗原がペプチドであることからクロマト担体に如何にして結合させるか、3. 抗体が検出されるまでの時間、すなわち測定する時期の問題、などがある。1に関しては、すでに選択したペプチドをウサギに免疫し、抗血清を得た。2に関しては、ペプチドを直接担体に結合する、あるいはキャリアーとしてアルブミンを用い、それを結合させる、その場合ペプチドのN-末端側かC-末端側のどちらを介して結合させた方が良いのかなどを検討した。また、3に関して、急性期

感染患者の70%以上を検出できることを確認したが、それでも擬陽性が30%近く残った。これを解決するためにはいくつかの方法が考えられる。すなわち、他のペプチドと組み合わせる、リコンビナントタンパクを用いる、あるいは本原理を用いたウイルス抗原の検出法を開発するなどが考えられる。測定時期に関して、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診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める頃となり、初期診断は困難である可能性が強い。

T細胞によって認識される標的蛋白質の一次構造からなるT細胞エピトープは、MHCのタイプによって決まる結合モチーフによって、候補ペプチドを選ぶことができる。従って、対象蛋白質はSARSウイルスがコードする11種類すべての蛋白質とした。その結果、HLA-A2および-A24結合モチーフを有する340種類のペプチドを合成した。合成した340種類のペプチドに対する抗体を健常人および感染者血清でスクリーニングしたところ、Group1:両者で有意な抗体が検出されなかったもの、Group2:感染者のみで抗体が検出されるもの、Group3:健常人に比べて感染者の方がより抗体価が高いもの、Group4:感染者だけでなく健常人でも抗体が検出されるものに分類された。久留米大学で行っているがんペプチドワクチンの臨床研究で、がんの治療ワクチンに用いるペプチドはワクチン投与前がん患者の抗体価が高いペプチドほど臨床効果がある(Mine et al, Clin Can Res, 2004)という結果から、本研究でも同じ方針でペプチドを選択することにした。すなわちGroup2が最も目的に合致するペプチドだと考えられるが、この中からCTL誘導能を有するペプチドを選択するためには感染患者末梢血が必要である。今後、感染国との共同研究が可能であれば治療ワクチンとしてのペプチド同定を行うこととしたい。

SARS感染症の免疫療法としてはスパイク糖タンパクの外側輪部分(ecto-domain)のワクチン投与で全スパイク糖タンパクの場合と同程度のウイルス中和抗体が産生されることがマウス及びサルを用いた実験で証明されている(Zhou Z et al, Vaccine, Feb 9,

2006)。Nucleocapsid protei (N)免疫マウス及びサルにおいて166-180、356-375、396-410の3種類のB細胞エピトープを同定し、これらのペプチドのうち156-175が5人のうち2人のSARS感染者と強く反応することが報告された(Liu SJ et al, Vaccine, Feb.8, 2006)。この結果は我々が同定したN161-175と一致する。さらに、Liuらは336-350のペプチドがISA-51と synthetic oligodeoxynucleotide, CpG (ISA/CpG)をアジュバントとしてNタンパクを免疫したサルでCTLを誘導することも示した。ちなみにISA/CpGは、免疫応答を劇的にTh1タイプに偏らせることも同時に報告している。SARS-CoVを不活化したワクチン(WKV)と、nucleocapsid(N)とspike(S)タンパクを発現するアデノウイルスベクター(Ad S/N)を比較した研究ではWKVの方がより効果的であるが、Ad S/Nを鼻粘膜から投与した場合はIgAが産生されてウイルスの肺での増殖が制限されている(See RH et al, J Gen Virol, 87, 641-50, 2006)。

一方、Group3、あるいはGroup4に分類されたペプチドに対しては健常人血清中に抗体が検出された。SARSウイルスはコロナウイルスに属し共通構造が存在する可能性がある。また、Group4の#74のペプチドレベルのホモロジーでは、Candida albicans SC5314に対して9アミノ酸中7アミノ酸が一致していた。また、抗体が存在した12種類のペプチドを用いて、健常人末梢血からCTL誘導を試みたところ10種類でペプチド特異的サイトカイン産生T細胞誘導能が認められた。これらのことから、外来性あるいは内因性の抗原に対する免疫反応の結果存在する抗ペプチド抗体が、防御的あるいはSARS特有の肺に対する自己免疫反応的に関与する可能性が考えられた。すなわち交差反応性T細胞性前駆細胞が存在しているところにSARSウイルスの感染が起こり、炎症性サイトカインの産生が制御できなくなった結果重篤な肺炎が続発する可能性が考えられる。炎症性応答の誘導と関連するtoll-like receptors 4 and 9がSARS-CoV感染によって亢進されるという報告(Okabayashi T et al, J Med Virol, 78, 417-424, 2006)もあり、この炎症性サイトカインの過剰産生がどのような細胞から賛成されるのかが重要であると考えられる。

E. 結論

S79Iペプチドを抗原としたイムノクロマト法により74%の感染初期患者血清中で抗体が検出できた。今後、リコンビナントタンパクを抗原としたイムノクロマト法や、ウイルス抗原を同定する測定系を確立する必要があると考えられた。また、T細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2および-A24結合性ペプチド340種類のうち、血清抗体が認識する12種類のペプチドを同定した。そ

のうち10種類のペプチドで健常人末梢血からのT細胞誘導が確認され、これらの抗体やCTL前駆細胞の存在意義の解析、さらに、感染患者末梢血からのCTL誘導能を有するペプチドの同定を行う必要がある。

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. Nishimura, H., Kuratsuji, T., Quy, T., Phi, N.C., Ban, V.V., Ha, L.D., Long, H.T., Yanai, H., Keicho, N., Kirikae, T., Sasazuki, T., Anderson, R.M.: Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam., 2005, Am. J. Trp. Med. Hyg., 73:17-25, 2005.

2. Hamano, E., Hijikata, M., Itoyama, S., Quy, T., Phi, N.-C., Long, T.-H., Ha, le-D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T., Keicho, N.: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. Biochem. Biophys. Res. Commun., 329: 1234-1239, 2005.

3. Itoyama, S., Keicho, N., Hijikata, M., Quy, T., Phi, N.-C., Long H.T., Ha, Le D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T. Sasazuki, T.: Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphism of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. Am J Med Genet A, 136: 52-57, 2005.

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 】

なし

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 】

糸山智, Tran Quy, Nguyen Phi Chi, Hoang Long T., Le Ha D., Vo Ban Van, 土方美奈子, 松下育美, 大橋順, 川名明彦, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人: Angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) の遺伝的多型と Severe acute respiratory syndrome (SARS) の重症化. 第45回日本呼吸器学会, 2005年4月15日, 幕張.

【 七條茂樹 分担研究者 】

なし

【 切替照雄 分担研究者 】

糸山智, Tran Quy, Nguyen Phi Chi, Hoang Long T., Le Ha D., Vo Ban Van, 土方美奈子, 松下育美, 大橋順, 川名明彦, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人: Angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) の遺伝的多型と Severe acute respiratory syndrome (SARS) の重症化. 第45回日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SARSイムノクロマト簡易診断試作品の評価およびHLA拘束性SARS-CoV由来ペプチドの設計

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) 1. 昨年度の本研究で同定したSARSウイルスの構造蛋白由来エピトープペプチドを用いた迅速診断法を確立する目的で、伊東、七條らが試作したイムノクロマトチャンバーの感染者血清による評価を行う。2. SARSのペプチドワクチンの開発及び病因解明のために、HLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドを選んだ。合成は伊東が担当した。(結果) 1. 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種類のうち急性期感染患者血清で陽性であった42種類のペプチドのうち感染6ヶ月後患者血清で有意に認識されるS791のペプチドを用いたイムノクロマト簡易型診断キット試作品で急性期感染患者血清を測定したところ、約70%で抗体を検出できることがわかった。2. ワクチン開発を目的として感染患者の液性免疫系に認識されるT細胞エピトープの同定を行うため、SARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス遺伝子がコードする蛋白質由来の9~10merペプチド(HLA-A2および-A24拘束性)をそれぞれ227および113種類(合計340種類)を選んだ。(考察) イムノクロマト法は設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。今回の試作品では約70%の検出率であったので、さらに感度を上げるための開発が必要であると考えられた。また、感染者及び健常人でのT細胞エピトープの同定は、これらのペプチドによる診断、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性が得られるものと考えられる。これらのペプチドのうち1つは他の微生物とのシークエンスホモロジーを有するペプチドであることが判明した。

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

(1) 1年目の本研究で同定した患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体により認識されるSevere Acute Respiratory Syndrome (SARS)ウイルスの構造蛋白エピトープペプチドを用いた迅速診断法を確立するため、感染者血清を用いて評価を行う。この方法により、設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。(2) HLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドに対する抗体を、1年目と同様な方法で測定し、抗体により認識されるT細胞エピトープペプチドを同定する。このペプチドによる診断的価値、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性について検討する。

B. 研究方法

血清収集、管理

SARS感染患者血清;血清試料は昨年度準備したものを使用した。感染初期に3名の台湾人より採血した血清はJen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より供与された(担当:伊東、笹月)。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(担当:切替、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米大学医療センターより供与された(担当: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(担当:切替)。

ペプチド

SARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド(HLA-A2および-A24拘束性)由来の9~10merペプチドをそれぞれ227および113種類(合計340種類)、純度70%以上で合成(担当:伊東、笹月)した。候補ペプチドは、HLA結合ペプチドデータベース(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)により検索し、HLA-A2およびHLA-A24それぞれに、スコアの高いものから合計340種類を選んだ。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、特異性などの確認実験を行った。

イムノクロマト簡易キット試作品の評価

昨年度ベトナムより入手し、国立国際医療センターで保管管理しているSARS-CoV感染者及びその対照血清を用いたS791ペプチドを用いたイムノクロマト簡易キット試作品(担当:伊東、七條)の評価を行った。血清との反応はP3相当クリーンルーム内のバイオハザードベンチ内で行った(担当:切替、笹月)。すなわち、ブロックエースで100倍に希釈した血清を200 μ L試料滴下位置に滴下し、20分経過後展開確認窓が赤く発色していることを確認する。判定窓の中央付近に赤紫色の線が見えるかどうかを確認する。赤紫色の線がない場合陰性、赤紫色の線が一本ある場合陽性と判定する。また、線の濃さを5段階に分け、3人独立に判定してその平均を最終評価とした。展開確認窓が赤くならない場合は、試料液が何らかの原因により、正常に展開していない可能性があるため別のキットでやり直すこととした。

抗体の測定

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)2 μ Lを、ペプチドを結合させたcolor-coded beads 25 μ L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、100 μ L streptavidin-PEと室温で30分間反応させた後3回洗浄し、100 μ LのT-PBSに再懸濁した後、Luminexで測定した(担当:七條、切替)。

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。

C. 研究結果

イムノクロマト法による抗体の簡易検出

昨年同定した3種類のペプチド(N161, M207, S791)のうちS791を用いた簡易診断のためのイムノクロマト簡

易キット試作品の評価を行う目的で、昨年度ベトナムより入手し、国立国際医療センターで保管管理しているSARS-CoV感染者及びその対照血清を用いて抗体の検出を行った。その結果、ルミネックス法でS791に対する抗体が陽性だった感染初期の27検体の患者血清でも確認された。すなわちC-末端結合法で20例(74%)が陽性だったのに対し、N-末端結合法では8例(30%)と検出率が低かった。

MHC拘束性エピトープの同定

ワクチン開発を目的として感染患者の液性免疫系に認識されるT細胞エピトープペプチドを同定した。SARSウイルス遺伝子がコードするタンパク由来9~10残基のアミノ酸からなるHLA-A2あるいはA24拘束性ペプチドをそれぞれ227および113(合計340)種類を3名の急性期感染患者血清、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スクリーニングしたところ、12種類のペプチドが陽性であった。Replicase, RNA-directed RNA polymerase が10種類(A2:#21,#74,#80,#119,#125;A24:#250,#281,#287,#295,#310)、spike (S)が1種類(A2:#174)、および putative uncharacterized protein 2が1種類(A2:#201)で、その他のコード遺伝子産物の陽性ペプチドはなかった。これらのペプチドのうち健常人および接触非感染者血清では検出されなかったGroup2(#125,#310)、健常人血清でも検出されるが患者と比較すると弱いGroup3(#80,#119,#201,#287)、両者ともに強く反応するGroup4(#21,#74,#174,#250,#281,#295)、および健常人及びSARS患者いずれも陰性のGroup1コントロールとしてRNA-directed RNA polymerase 由来の#289及びspike (S)由来A24拘束性の#328を選んだ。

D. 考察

SARSウイルスに対するIgG抗体は中和抗体とよく関連し、4ヶ月をピークにその後減少する。そして、16ヶ月くらいまではすべての患者で検出され、24ヶ月で約12%の患者が検出できなくなる(Liu W et al, J Infect Dis, 193. 792-5, 2006)といわれている。我々は昨年度の本研究で、Luminexを用いたflowmetry法により長期持続免疫抗体が認識するSARS-CoV構造蛋白質由来エピトープペプチド3種類を同定した。本研究ではこれらのペプチドを用いてイムノクロマトによる迅速診断法の開発を行った。この方法は特殊な設備や機器がない場所でも、すばやく簡単に測定できるというメリットがあることから、インフルエンザ抗原の検査に用いられている。申請者と切替分担研究者は、S791ペプチドを用いて作成したイムノクロマト簡易測定キット試作品の患者血清による評価を分担した。すなわち急性期感染患者の70%以上を検出できるこ

とを確認したが、それでも擬陽性が30%近く残った。これを解決するためにはいくつかの方法が考えられる。すなわち、他のペプチドと組み合わせる、リコンビナントタンパクを用いる、あるいは本原理を用いたウイルス抗原の検出法を開発するなどが考えられる。測定時期に関して、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診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出始める頃となり、初期診断は困難である可能性が高い。

T細胞によって認識される標的蛋白質の一次構造からなるT細胞エピトープは、MHCのタイプによって決まる結合モチーフによって、候補ペプチドを選ぶことができる。従って、対象蛋白質はSARSウイルスがコードする11種類すべての蛋白質とした。その結果、HLA-A2および-A24結合モチーフを有する340種類のペプチドを合成した。合成した340種類のペプチドに対する抗体を健常人および感染者血清でスクリーニングしたところ、Group1:両者で有意な抗体が検出されなかったもの、Group2:感染者のみで抗体が検出されるもの、Group3:健常人に比べて感染者の方がより抗体価が高いもの、Group4:感染者だけでなく健常人でも抗体が検出されるものに分類された。久留米大学で行っているがんペプチドワクチンの臨床研究で、がんの治療ワクチンに用いるペプチドはワクチン投与前がん患者の抗体価が高いペプチドほど臨床効果がある(Mine et al, Clin Can Res, 2004)という結果から、本研究でも同じ方針でペプチドを選択することにした。すなわちGroup2が最も目的に合致するペプチドだと考えられるが、この中からCTL誘導能を有するペプチドを選択するためには感染患者末梢血が必要である。今後、感染国との共同研究が可能であれば治療ワクチンとしてのペプチド同定を行うこととしたい。

E. 結論

S791ペプチドを抗原としたイムノクロマト法簡易測定キット試作品の評価を行った。約70%のSARS-CoV感染初期患者血清中で抗体が検出できた。今後、ペプチドの種類を増やす、リコンビナントタンパクを抗原とする、あるいはウイルス抗原を同定する測定系を確立するな

どの検討が必要があると考えられた。

また、T細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2および-A24結合性ペプチドをHLA結合ペプチドデータベースで検索し、スコアの高いものから340種類を選び出した。これらのペプチドを合成(担当:伊東)し、患者血清抗体により認識されるペプチドを選び(担当:切替、七條)、それらを用いたCTL誘導実験に使用(担当:七條、伊東)した。

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. Nishimura, H., Kuratsuji, T., Quy, T., Phi, N.C., Ban, V.V., Ha, L.D., Long, H.T., Yanai, H., Keicho, N., Kirikae, T., Sasazuki, T., Anderson, R.M.: Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam., 2005, Am. J. Trp. Med. Hyg., 73:17-25, 2005.

2. Hamano, E., Hijikata, M., Itoyama, S., Quy, T., Phi, N.-C., Long, T.-H., Ha, le-D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T., Keicho, N.: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. Biochem. Biophysic. Res. Commun., 329: 1234-1239, 2005.

3. Itoyama, S., Keicho, N., Hijikata, M., Quy, T., Phi, N.-C., Long H.T., Ha, Le D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphism of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. Am J Med Genet A, 136: 52-57, 2005.

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)

糸山智, Tran Quy, Nguyen Phi Chi, Hoang Long T., Le Ha D., Vo Ban Van, 土方美奈子, 松下育美, 大橋順, 川名明彦, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人: Angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) の遺伝的多型と Severe acute respiratory syndrome (SARS) の重症化. 第45回日本呼吸器学会, 2005年4月15日, 幕張.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SARS簡易診断のためのイムノクロマト試作品の開発およびHLA拘束性T細胞エピトープの同定

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) 1. 昨年度同定した3種類のペプチド(S791, M207, N161)を用いた迅速診断法を確立するために、イムノクロマト診断キットの試作を行う。2. SARSのペプチドワクチンの開発及び病因解明を目的とし、抗体およびT細胞に認識される、HLA-A2およびHLA-A24拘束性エピトープペプチドを同定する。(結果) 1. 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3種類のペプチドを用いたイムノクロマト簡易型診断キットを作成するために、ペプチドのマトリックスへの結合様式の検討を行い、C-末端側を介してアルブミン担体に結合させた複合体をチェンバー担体に固相化したほうが、ペプチドを直接結合させたり、N-末端側を介してアルブミンに結合させたものより感度良く抗体を検出できることを見出した。この試作品によりS791に対して約70%の感染者で抗体を検出できた。2. ワクチン開発を目的として感染患者の液性免疫系に認識される12種類のペプチドに対するIgG抗体が検出され、それらのうち健常日本人末梢単核細胞を用いてCTL誘導実験を実施したところ、幾つかのペプチドで強いCTL誘導が認められた。これらのペプチドのうち1つは他の微生物とのシークエンスホモロジーを有するペプチドであることが判明した。(考察) イムノクロマト法は設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。また、感染者及び健常人でのT細胞エピトープの同定は、これらのペプチドによる診断、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性が得られるものと考えられる。

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

1. 昨年度同定したSARS-CoV感染特異的に長期間免疫応答が持続する抗体により認識されるSevere Acute Respiratory Syndrome (SARS)ウイルスの構造蛋白エピトープペプチドを用いた迅速診断法を確立する。この方法により、設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。

2. HLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドに対する抗体を、1年目と同様な方法で測定し、抗体により認識されるT細胞エピトープペプチドを同定する。このペプチドによる診断的価値、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性について検討する。

B. 研究方法

患者血清: SARS感染患者血清収集は昨年度切替、笹月分担研究者が行い、その管理は国立国際医療センターで行っている。したがって、患者血清を用いた実験はすべて両分担者の指導の下行った。

ペプチド: イムノクロマトのためのペプチド3種類(S791, M207, N161)は90%以上の純度で合成し、ウサギへの免疫、イムノクロマトチェンバー条件検討及び作

成に用いた。またSARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド(HLA-A2およびA24拘束性)由来の9~10merペプチドをそれぞれ227および113種類(合計340種類)、純度70%以上で合成(担当:伊東、笹月)した物を本研究に使用した。

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、特異性などの確認および健常人末梢血からのCTL誘導実験を行った。各ペプチドはdimethylsulfoxide(DMSO)に10mg/mLの濃度で溶かし、-20°Cで保存した。

ウサギ抗ペプチド抗体の作成(担当:七條、伊東)
ペプチドに対する抗体を作成する目的で、昨年同定した3種類のペプチド(N161, M207, S791)をそれぞれKLH(キャリアータンパク: Inject Immunogen EDC Conjugation Kit with mcKLH, Rockford, IL)に結合させた。すなわち、①2mg mcKLHを200 μ Lの脱イオン水に溶かす。②2mgのペプチドをConjugation Buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, 0.02% NaN₃, pH4.7)に溶かす。③500 μ Lのペプチド溶液を200 μ gキャリアータンパク溶液に加える。④EDC 1vialを1mLの脱イオン水に溶かし、この溶液50 μ Lをキャリアー・ペプチド溶液に直ちに加える。⑤室温で2時間静置する。⑥透析により、NaN₃およ

びConjugation Bufferを除く。⑦280nmにおける吸光度を測定してペプチド-KLH複合体の濃度を決める。また、ウサギへの免疫は、①MPL + TDM Emulsion, R700 [アジュバント：RIBI Adjuvant system (RAS)(RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)]に、KLH(キャリアタンパク)–ペプチド複合体溶液を2ml入れ、37°C恒温槽で暖めて乳濁液を作成する。②100μLずつ、背中6カ所に毎週、10回以上皮内注射する。③免疫ウサギ耳朶より抗体測定のために採血する。

抗体の測定(担当：七條、切替)

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。

末梢血単核球からのCTL誘導

陰性及び陽性コントロールのペプチド(最終濃度：10μg/mL)とともに、健常人5名末梢血から分離した単核球細胞(1x10⁵/well)を96穴マイクロプレートに加え、5%CO₂インキュベーター内で培養する。培養には45%AIM-V, MEM non essential amino acid solution, 7.5x10⁴units/mL IL-2, 40mg/Amp/mLゲンタマイシンを含む45%RPMI1640, および10%FCSの組成の培養液を用いた。

2倍濃度のペプチドが入った上記培養液で3日おきに培養上精の半量を交換する操作を4~5回繰り返

えて培養を継続し、13日目にペプチドを入れない培養液で上記操作を行う。

CTL活性測定のエフェクター細胞の調整:IL-2添加培養液を無添加10%FCS/RPMI1640倍溶液に交換するし、以下の実験に用いる。

活性化リンパ球測定:CTL活性はIFN-γ産生を指標に検出する。産生IFN-γ濃度測定はELISA法で行う。HLA-A2拘束性ペプチドはT2細胞株、HLA-A24拘束性細胞はC1R2402細胞株をそれぞれ用い、各ペプチドの終濃度が40μg/mLになるようにそれぞれの標的細胞(2x10⁵ cells/mL, 50μL/well)とともに96穴平底プレートに加える。2時間、37°Cで培養後、エフェクター細胞を加える。37°C、18時間培養後、上精中のIFN-γを測定する。

(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。

C. 研究結果

イムノクロマト法による抗体の簡易検出

昨年同定した3種類のペプチド(N161, M207, S791)のうちS791を用いたイムノクロマトによる簡易診断法の開発を試みた。開発にはウサギ抗血清を作成して用いた。3種類のペプチドをそれぞれ2羽ずつのウサギに免疫し、ルミネックスを用いたフローメトリー法で抗体価の測定を行った。N161およびM207に対しては高力価の抗血清が得られなかった。そこで最も力価が高いウサギ抗S791抗血清を用いて以下の実験を行った。ペプチドをイムノクロマト担体に直接結合させるよりもアルブミンなどの単体と複合体にして結合させた方がより感度が高いことがわかった。さらに、ペプチドのN-末端及びC-末端を介してアルブミンに結合させた複合体をイムノクロマト担体に固相化した時の反応性をウサギ抗血清を用いて調べたところ、後者(C-末端)の方が前者(N-末端)に比べて感度が高いことがわかった。このことからペプチドを抗原とする場合結合様式が重要であることが示唆された。この結果はルミネックス法でS791に対する抗体が陽性だった感染初期の27検体の患者血清でも確認された(担当：切替、笹月)。すなわちC-末端結合法で20例(74%)が陽性だったのに対し、N-末端結合法では8例(30%)と検出率が低かった。

MHC拘束性エピトープの同定:ワクチン開発を目的として感染患者の液性免疫系に認識されるT細胞エピ

トープペプチドを同定した。SARSウイルス遺伝子がコードするタンパク由来9～10残基のアミノ酸からなるHLA-A2あるいは-A24拘束性ペプチドをそれぞれ227および113(合計340)種類を3名の急性期感染患者血清、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スクリーニングしたところ、12種類のペプチドが陽性であった。Replicase, RNA-directed RNA polymerase が10種類(A2:#21,#74, #80, #119, #125; A24:#250, #281, #287, #295, #310)、spike (S)が1種類(A2:#174)、および putative uncharacterized protein 2 が1種類(A2:#201)で、その他のコード遺伝子産物の陽性ペプチドはなかった。これらのペプチドのうち健常人および接触非感染者血清では検出されなかったGroup2(#125, #310)、健常人血清でも検出されるが患者と比較すると弱いGroup3(#80, #119, #201, #287)、両者ともに強く反応するGroup4(#21, #74, #174, #250, #281, #295)、および健常人及びSARS患者いずれも陰性のGroup1コントロールとしてRNA-directed RNA polymerase 由来の#289及びspike (S)由来A24拘束性の#328を選んだ。

CTL誘導: 健常人及び感染者血清中抗体で選別した12種類と対照2種類(合計14種類)のペプチドに対して、健常人(5人)末梢血からT細胞誘導能を有するペプチドを9種類(#21, #74, #80, #250, #281, #287, #289, #295, #310) 同定した。五人中一人でも誘導された場合を陽性と判定した。#289と#328は、抗体により検出されなかった陰性コントロールとしてT細胞誘導実験を行ったが、それぞれ5人中3人及び1人で誘導された。このことは、抗体の存在が、T細胞誘導にとって必ずしも必要十分条件ではないことを示している。

D. 考察

昨年度の本研究で、Luminexを用いたflowmetry法により長期持続免疫抗体が認識するSARS-CoV構造蛋白質由来エピトープペプチド3種類を同定した。SARSウイルスに対するIgG抗体は中和抗体とよく相関し、4ヶ月をピークにその後減少する。そして、16ヶ月くらいまではすべての患者で検出され、24ヶ月で約12%の患者が検出できなくなる(Liu W et al, J Infect Dis, 193, 792-5, 2006)といわれている。本研究ではこれらのペプチドを用いてイムノクロマトによる迅速診断法の開発を行った。この方法は特殊な設備や機器がない場所でも、すばやく簡単に測定できるというメリットがあることから、インフルエンザ抗原の検査に用いられている。開発に当たっての問題点として、1. 幸いにもSARS患者が日本で発生せず、したがって診断法の開発をするための抗体を如何に得るか、2. 抗原がペプチドであることからクロマト担体に

如何にして結合させるか、3. 抗体が検出されるまでの時間、すなわち測定する時期の問題、などがある。1に関しては、すでに選択したペプチドをウサギに免疫し、抗血清を得た。2に関しては、ペプチドを直接担体に結合する、あるいはキャリアーとしてアルブミンを用い、それを結合させる、その場合ペプチドのN-末端側かC-末端側のどちらを介して結合させた方が良いのかなどを検討した。また、3に関して、急性期感染患者の70%以上を検出できることを確認したが、それでも擬陽性が30%近く残った。これを解決するためにはいくつかの方法が考えられる。すなわち、他のペプチドと組み合わせる、リコンビナントタンパクを用いる、あるいは本原理を用いたウイルス抗原の検出法を開発するなどが考えられる。測定時期に関して、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診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。

T細胞によって認識される標的蛋白質の一次構造からなるT細胞エピトープは、MHCのタイプによって決まる結合モチーフによって、候補ペプチドを選ぶことができる。従って、対象蛋白質はSARSウイルスがコードする11種類すべての蛋白質とした。その結果、HLA-A2および-A24結合モチーフを有する340種類のペプチドを合成した。合成した340種類のペプチドに対する抗体を健常人および感染者血清でスクリーニングしたところ、Group1:両者で有意な抗体が検出されなかったもの、Group2:感染者のみで抗体かが検出されるもの、Group3:健常人に比べて感染者の方がより抗体価が高いもの、Group4:感染者だけでなく健常人でも抗体が検出されるものに分類された。久留米大学で行っているがんペプチドワクチンの臨床研究で、がんの治療ワクチンに用いるペプチドはワクチン投与前がん患者の抗体価が高いペプチドほど臨床効果がある(Mine et al, Clin Can Res, 2004)という結果から、本研究でも同じ方針でペプチドを選択することにした。すなわちGroup2が最も目的に合致するペプチドだと考えられるが、この中からCTL誘導能を有するペプチドを選択するためには感染患者末梢血が必要である。今後、感染国との共同研究が可

能であれば治療ワクチンとしてのペプチド同定を行いたい。

SARS感染症の免疫療法としてはスパイク糖タンパクの外側輪部分(ecto-domain)のワクチン投与で全スパイク糖タンパクの場合と同程度のウイルス中和抗体が産生されることがマウス及びサルを用いた実験で証明されている(Zhou Z et al, Vaccine, Feb 9, 2006)。Nucleocapsid protei (N)免疫マウス及びサルにおいて166-180、356-375、396-410の3種類のB細胞エピトープを同定し、これらのペプチドのうち156-175が5人のうち2人のSARS感染者と強く反応することが報告された(Liu SJ et al, Vaccine, Feb.8, 2006)。この結果は我々が同定したN161-175と一致する。さらに、Liuらは336-350のペプチドがISA-51とsynthetic oligodeoxynucleotide, CpG (ISA/CpG)をアジュバントとしてNタンパクを免疫したサルでCTLを誘導することも示した。ちなみにISA/CpGは、免疫応答を劇的にTh1タイプに偏らせることも同時に報告している。SARS-CoVを不活化したワクチン(WKV)と、nucleocapsid(N)とspike(S)タンパクを発現するアデノウイルスベクター(Ad S/N)を比較した研究ではWKVの方がより効果的であるが、Ad S/Nを鼻粘膜から投与した場合はIgAが産生されてウイルスの肺での増殖が制限されている(See RH et al, J Gen Virol, 87, 641-50, 2006)。

一方、Group3、あるいはGroup4に分類されたペプチドに対しては健常人血清中に抗体が検出された。SARSウイルスはコロナウイルスに属し共通構造が存在する可能性がある。また、Group4の#74のペプチドレベルのホモロジーでは、Candida albicans SC5314に対して9アミノ酸中7アミノ酸が一致していた。また、抗体が存在した12種類のペプチドを用いて、健常人末梢血からCTL誘導を試みたところ10種類でペプチド特異的サイトカイン産生T細胞誘導能が認められた。これらのことから、外来性あるいは内因性の抗原に対する免疫反応の結果存在する抗ペプチド抗体が、防御的あるいはSARS特有の肺に対する自己免疫反応的に関与する可能性が考えられた。すなわち交差反応性T細胞性前駆細胞が存在しているところにSARSウイルスの感染が起こり、炎症性サイトカインの産生が制御できなくなった結果重篤な肺炎が続発する可能性が考えられる。炎症性応答の誘導と関連するtoll-like receptors 4 and 9がSARS-CoV感染によって亢進されるという報告(Okabayashi T et al, J Med Virol, 78, 417-424, 2006)もあり、この炎症性サイトカインの過剰産生がどのような細胞から産生されるのかが重要であると考えられる。

E. 結論

S791ペプチドを抗原としたイムノクロマト法により74%の感染初期患者血清中で抗体が検出できた。今後、リコンビナント蛋白を抗原としたイムノクロマト法や、ウイルス抗原を同定する測定系を確立する必要があると考えられた。

T細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2および-A24結合性ペプチド340種類のうち、血清抗体が認識する12種類のペプチドを同定した。そのうち9種類のペプチドで日本人健常人末梢血からのT細胞誘導が確認された。これらのペプチドの中には他の微生物とのシークエンスホモロジーを有するペプチドがあることが判明した。これらの抗体やCTL前駆細胞の存在意義の解析、さらに、感染患者末梢血からのCTL誘導能を有するペプチドの同定を行う必要がある。

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)
なし

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
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

SARSイムノクロマト簡易診断試作品の評価およびHLA拘束性T細胞エピトープの同定

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)1. 昨年度の本研究で同定したSARS-CoV構造蛋白由来エピトープペプチドを用いた迅速診断法を確立するために、伊東、七條らが試作したイムノクロマトの検証を患者血清で測定することにより行う。2. ペプチドワクチン開発及び病因解明を目的に、笹月、伊東らが設計し合成したHLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドを感染者血清で測定し、抗体により認識されるT細胞エピトープペプチドを同定する。(結果)1. 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種類のうち急性期感染患者血清で陽性であった42種類のペプチドのうち感染6ヶ月後患者血清で有意に認識されるS791のペプチドを用いたイムノクロマト簡易型診断キット試作品で急性期感染患者血清を測定したところ、約70%で抗体を検出できることがわかった。2. ワクチン開発を目的として感染患者の液性免疫系に認識されるT細胞エピトープの同定を行った。その結果、12種類でそれらのペプチドに対するIgG抗体が感染者血清中に高率に検出された。その中のいくつかは健常人血清抗体にも認識された。(考察)イムノクロマト法は設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。今回の試作品では約70%の検出率であったので、さらに感度を上げるための開発が必要であると考えられた。また、感染者及び健常人でのT細胞エピトープの同定は、これらのペプチドによる診断、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性が得られるものと考えられる。これらのペプチドのうち1つは他の微生物とのシークエンスホモロジーを有するペプチドであることが判明した。

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

(1) 1年目の本研究で同定した患者特異的に長期間免疫応答が持続する抗体により認識されるSevere Acute Respiratory Syndrome (SARS)ウイルスの構造蛋白エピトープペプチドを用いた迅速診断法を確立する。この方法により、設備がない地域での迅速検査が可能となるため、感染力が強く且つ致死的な感染症の感染拡大の抑止に効果的であると考えられる。(2) HLA-A2およびHLA-A24拘束性ペプチドに対する抗体を、1年目と同様な方法で測定し、抗体により認識されるT細胞エピトープペプチドを同定する。このペプチドによる診断的価値、病態機序の解明、および治療ワクチンへの応用の可能性について検討する。

B. 研究方法

血清収集、管理

SARS感染患者血清:血清試料は昨年度準備したものを使用した。すなわち、感染初期に3名の台湾人より採血した血清:Jen-Ai Municipal Hospital (SaAn District, Taipei, Taiwan)より供与(担当:伊東、笹月)。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:ベトナムのHanoi French Hospital

およびMai Hospitalより供与された(担当:切替、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:久留米大学病院および久留米大学医療センターより供与(担当: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(担当:切替)。

ペプチド

SARS-CoVのゲノム遺伝子配列(Accession AY278488.2)からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド(HLA-A2およびA24拘束性)由来の9~10merペプチドをそれぞれ227および113種類(合計340種類)、純度70%以上で合成した(担当:伊東、笹月)がペプチドを用いるミネックス測定用ビーズを作成した(担当:七條)がものを抗体測定に用いた。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、特異性などの確認実験に用いた。各ペプチドはdimethylsulfoxide(DMSO)に10mg/mlの濃度で溶かし、-20℃で保存した。

イムノクロマト簡易キット試作品の評価

昨年度ベトナムより入手し、国立国際医療センターで保管管理しているSARS-CoV感染者及びその対照血清を用いたS791ペプチドを用いたイムノクロマト簡易キット試作品(担当:伊東、七條)の評価を行った。血清との反応はP3相当クリーンルーム内のバイオハザードベンチ内で行った(担当:切替、笹月)。すなわち、ブロックエースで100倍に希釈した血清を200 μ L試料滴下位置に滴下し、20分経過後展開確認窓が赤く発色していることを確認する。判定窓の中央付近に赤紫色の線が見えるかどうかを確認する。赤紫色の線がない場合陰性、赤紫色の線が一本ある場合陽性と判定する。また、線の濃さを5段階に分け、3人独立に判定してその平均を最終評価とした。展開確認窓が赤くならない場合は、試料液が何らかの原因により、正常に展開していない可能性があるため別のキットでやり直すこととした。

患者血清抗体の測定

各種ペプチドに対する抗体は、Luminexを用いたflowmetryで行った(切替、七條)。即ち、100から10000倍に希釈した血清(または血漿)2 μ Lを、ペプチドを結合させたcolor-coded beads 25 μ L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、100 μ L streptoavidin-PEと室温で30分間反応させた後3回洗浄し、100 μ LのT-PBSに再懸濁した後、Luminexで測定した。

実験操作は全て高度安全管理室(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。

C. 研究結果

イムノクロマト法による抗体の簡易検出

昨年同定した3種類のペプチド(N161, M207, S791)のうちS791を用いた簡易診断法の開発を目的に伊東、七條らがイムノクロマトによる測定チェンバーの試作品

を開発した。そこで、ルミネックス法でS791に対する抗体が陽性だった感染初期の27検体の患者血清を用いて測定したところ、アルブミン担体にペプチドのC-末端側を用いてイムノクロマト担体に結合したチェンバーで測定した場合、20例(74%)が陽性だったのに対し、N-末端側で結合した場合は8例(30%)と検出率が低い事がわかった。より検出率を上げるためには、他の2種類のペプチドも含めてエピトープの種類を増やす、あるいはリコンビナント蛋白を抗原として用いる、さらには抗体ではなくウイルス抗原を検出するなどの今後の検討が必要だと思われる。

MHC拘束性エピトープの同定

ワクチン開発及び病態解析を目的としてSARS-CoV感染患者のT細胞エピトープペプチドを同定した。伊東、笹月らが設計し合成したSARSウイルス遺伝子がコードするタンパク由来9~10残基のアミノ酸からなるHLA-A2あるいは-A24拘束性ペプチドをそれぞれ227および113(合計340)種類を3名の急性期感染患者血清、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スクリーニングしたところ、Replicase, RNA-directed RNA polymerase が10種類(A2:#21,#74, #80, #119, #125;A24:#250, #281, #287, #295, #310)、spike (S)が1種類(A2:#174)、および putative uncharacterized protein 2が1種類(A2:#201)の12種類のペプチドが陽性であった。その他のコード遺伝子産物の陽性ペプチドはなかった。これらの抗体は、必ずしも感染者特異的というわけではなく、強弱はあるものの健常人でも認められるものもあった。

D. 考察

昨年度の本研究で、Luminexを用いたflowmetry法により長期持続免疫抗体が認識するSARS-CoV構造蛋白質由来エピトープペプチド3種類を同定した。SARSウイルスに対するIgG抗体は中和抗体とよく相関し、4ヶ月をピークにその後減少する。そして、16ヶ月くらいまではすべての患者で検出され、24ヶ月で約12%の患者が検出できなくなる(Liu W et al, J Infect Dis, 193. 792-5, 2006)といわれている。本研究ではこれらのペプチドを用いてイムノクロマトによる迅速診断法の開発を行った。この方法は特殊な設備や機器がない場所でも、すばやく簡単に測定できるというメリットがあることから、インフルエンザ抗原の検査に用いられている。開発に当たっての問題点として、抗体が検出されるまでの時間、すなわち測定する時期の問題、などがある。急性期感染患者の70%以上を検出できることを確認したが、30%近くの陰性が残った。これを解決するためにはいくつかの方法が考えられる。すなわち、他のペプチドと組み合わせ

る、リコンビナントタンパクを用いる、あるいは本原理を用いたウイルス抗原の検出法を開発するなどが考えられる。測定時期に関して、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診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出始める頃となり、初期診断は困難である可能性が高い。

久留米大学で行っているがんペプチドワクチンの臨床研究で、がんの治療ワクチンに用いるペプチドはワクチン投与前がん患者の抗体価が高いペプチドほど臨床効果がある(Mine et al, Clin Can Res, 2004)という結果から、本研究でも同じ方針でペプチドを選択することにした。すなわち、合成した340種類のペプチド(担当:伊東、笹月)に対する抗体を健常人および感染者血清でスクリーニングした。その結果、Group1:両者で有意な抗体が検出されなかったもの、Group2:感染者のみで抗体が検出されるもの、Group3:健常人に比べて感染者の方がより抗体価が高いもの、Group4:感染者だけでなく健常人でも抗体が検出されるものに分類された。すなわちGroup2が最も目的に合致するペプチドだと考えられるが、この中からCTL誘導能を有するペプチドを選択するためには感染患者末梢血が必要である。今後、感染国との共同研究が可能であれば治療ワクチンとしてのペプチド同定を行うこととしたい。

E. 結論

S791ペプチドを抗原としたイムノクロマト法により74%の感染初期患者血清中で抗体が検出できた。今後、リコンビナントタンパクを抗原としたイムノクロマト法や、ウイルス抗原を同定する測定系を確立する必要があると考えられた。

T細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2および-A24結合性ペプチド340種類のうち、血清抗体が認識する12種類のペプチドを同定した。そのうち10種類のペプチドで日本人健常人末梢血からのT細胞誘導が確認された。これらのペプチドの中には他の微生物とのシークエンスホモロジーを有するペプチドがあることが判明した。これらの抗体やCTL前駆細胞の存在意義の解析、さらに、感染患者末梢血からのCTL誘導能を有するペプチドの同定を行う必要がある。

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. Nishimura, H., Kuratsuji, T., Quy, T., Phi, N.C., Ban, V.V., Ha, L.D., Long, H.T., Yanai, H., Keicho, N., Kirikae, T., Sasazuki, T., Anderson, R.M.: Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam., 2005, Am J Trp Med Hyg, 73:17-25, 2005.

2. Hamano, E., Hijikata, M., Itoyama, S., Quy, T., Phi, N.-C., Long, T.-H., Ha, le-D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T., Keicho, N.: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. Biochem Biophys Res Commun, 329: 1234-1239, 2005.

3. Itoyama, S., Keicho, N., Hijikata, M., Quy, T., Phi, N.-C., Long H. T., Ha, Le D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T. Sasazuki, T.: Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphism of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. Am J Med Genet A, 136: 52-57, 2005.

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)

糸山智, Tran Quy, Nguyen Phi Chi, Hoang Long T., Le Ha D., Vo Ban Van, 土方美奈子, 松下育美, 大橋順, 川名明彦, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人: Angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) の遺伝的多型と Severe acute

- | | |
|---|-----------------|
| respiratory syndrome(SARS)の重症化. 第 45 回日本呼吸器学会, 2005 年 4 月 15 日, 幕張. | 2. 実用新案登録
なし |
| H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) | 3. その他 |
| 1. 特許取得
なし | なし |