

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

# ヒト型抗SARS中和抗体の開発研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18(2006)年3月

主任研究者

切 替 照 雄

## 目 次

### I. 総括報告書

#### ヒト型抗 SARS 中和抗体の開発研究

切替 照雄 . . . . . 1

### II. 分担研究報告書

#### 中国との研究調整

笹月 健彦 . . . . . 11

#### SARS ウイルス抗原ペプチドを用いた抗体反応性エピトープの同定

七條 茂樹 . . . . . 19

#### ウイルス中和活性の測定

田代 真人 . . . . . 23

#### ヒト型ウシを用いたヒト型抗体の作成

石田 功 . . . . . 27

### III. 研究成果の刊行物・別刷

. . . . . 37

# I. 総括研究報告書

総括研究報告書

ヒト型抗 SARS 中和抗体の開発研究

主任研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨

本研究の目的は、SARS コロナウイルス (CoV) の感染防御、感染後の SARS 発症予防、さらに SARS 発症後の重症化予防と治療を目指して、ヒト型ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発を行うことである。本年度は、昨年度同定した、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 3 種類のエピトープを元に、ペプチド、組換え蛋白質などを設計・作成し、ヒト型抗体産生マウス、および通常のウサギへの免疫実験、および得られた血清の *in vitro* SARS-CoV 中和試験を実施した。またヒト型抗体産生ウシの免疫実験のための基礎情報を収集するため、野生型ウシでの免疫実験を開始した。また得られたエピトープ情報を元に、ペプチドワクチン開発にも着手した。ヒト型中和抗体の評価を行うための、サルを用いた *in vivo* での SARS ウイルス感染実験に関する研究契約を中国と締結を行った。

分担研究者

笹月 健彦 (国立国際医療センター総長)  
田代 真人 (国立感染症研究所部長)  
七條 茂樹 (久留米大学医学部助教授)  
石田 功 (キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬フロンティア研究所長)

のタンパクのうち、表面抗原である spike protein の全領域について、N 末から 15 個のアミノ酸からなり、かつ隣同士が 5 個のアミノ酸をオーバーラップするようなペプチドを合成し、SARS 患者血清と反応する多数の抗原エピトープを同定した。本年度はこれらのエピトープ情報を元に、SARS ウイルス感染サルなど実験モデル動物を用いて感染予防、発症予防に寄与する抗体を誘導可能な SARS ウイルス抗原を探索するため、ペプチドの設計・合成および組み換え蛋白質の大量精製系の確立などを行う。得られた抗原候補はヒト型抗体産生マウス、通常のウサギやウシに免疫し、抗原性や中和抗体誘導能の評価を行って、ヒト型抗体大量産生のためのヒト型抗体産生ウシへの投与抗原の絞り込みを行っていく。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群(SARS)は、その致命率の高さ(約 10%)、superspreader の存在などから、人間活動の国際化と相まって、一地方病としてではなく、I 類の国際感染症として各地域・国の経済にも多大の影響を及ぼした。

医師・看護師、臨床検査技師などは常に感染の危険にさらされており、いったん患者が発生すると、これら、医療従事者のみならず、一般国民の感染予防・発症予防・重症化予防と治療法の確立は国際的な急務である。

本研究においては、SARS ウイルス感染予防、感染後の発症予防、発症後の重症化予防と治療法確立を目的とし、ヒト型ウシを用いたヒト型中和抗体の開発を目指す。

昨年度中に、SARS ウイルスゲノムにコードされた 15 種

SARS が再度流行する可能性は十分に考えられ、その際に治療法を確立しておくことは国民の福祉に多大な貢献をするのみならず、経済的にも大切である。SARS は、いったん患者が発生すると、これら、医療従事者のみならず、一般国民の感染予防・発症予防・重症化予防と治療法の確立は国際的な急務である。

B. 研究方法

## 1. 抗原ペプチドのデザイン

昨年度選定された SARS 患者に特異的なペプチドの配列 (図 1) を元にペプチドを合成した。これらの配列をそのまま利用したものを合成した他、それらの抗原性を高めるため、多重抗原ペプチド (MAP) 修飾したものも合成した。さらにマウス MHC クラス II 結合配列と融合させることで、ペプチド抗原に対する反応性が高まることが報告されているので、この知見を元にインフルエンザ血球凝集素ペプチドまたはユビキチン卵白アルブミンペプチドとこれらの配列を融合させたものの、総計 4 種類のデザインを行った (図 2)。

## 2. 組換え蛋白質の調整

各組換え蛋白質は大量発現が容易な大腸菌のシステムを選択した。発現用宿主大腸菌として、組換え蛋白質の発現が発現誘導時まで高度に制御される菌株、コドンバイアスを考慮した菌株、組換え蛋白質の分解を抑制するようプロテアーゼを欠損した株などを必要に応じて使用した。

当該組換え蛋白質の精製を容易にするため、各蛋白質とも His-Tag 融合蛋白質となるように設計した。発現用プラスミドとして、Invitrogen 社の pDEST17 および QIAGEN 社の TAGzyme pQE2 を使用した。His-Tag が除去可能な設計とするため、前者では TEV プロテアーゼというエンドプロテアーゼの認識部位を His-Tag 直下に導入した。

大腸菌での大量発現の確認後、組換え蛋白質を超音波処理などにより可溶化した。得られた可溶化分画は常法に従い、ニッケルキレートカラムに添加し、十分に洗浄した後、イミダゾールなどによる溶出を行った。His-Tag 除去は pDEST17 誘导体由来の組換え蛋白質は TEV プロテアーゼにより、pQE2 誘导体由来の組換え蛋白質はジアミノペプチダーゼにより行った (図 4)。

## 4. 抗体中和活性試験の確立

SARS-CoV は Vero E6 細胞に感染し、細胞変性を起

こすことが知られている。本年度は昨年度構築した測定系を改良した。すなわちウイルスの細胞への付着操作後、メチルセルロースを添加することでウイルスの拡散を抑制し、ウイルスの細胞への感染の有無をプラークとして計数可能とし、より定量性を高めた。

## 3. 中国との研究調整

昨年度、笹月は、中国医学科学院 (CAMS) 実験動物研究所、中国科学院生物物理研究所、清華大学理学部及び中国医学科学院中国协和医科大学の研究者と共同研究の可能性を話し合った。本年度はこれらの話し合いを基に、切替や石田功を中国に派遣し、具体的なサル SARS ウイルス感染実験に関する研究契約の締結を行った。

(倫理面への配慮)

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。本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。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

### 1. 抗原ペプチドのデザイン

昨年度中に、S, N, M および E の各 SARS-CoV 構成タンパク由来の合計 197 種類のペプチドと SARS 患者血清との反応性の解析を完了している。スクリーニングは 197 種類のペプチド×患者数、という膨大な解析数が必要であったため、ペプチドをビーズに固定し、Luminx フローサイトメトリで反応性を検証するという迅速スクリーニング法により実施した。この解析により迅速診断キット開発に好適と思われる患者血清との反応陽性率が特に高い S791, M207 お

よび N161 のペプチドの絞り込みを完了している。これらの配列をそのまま利用したものを合成した他、それらの抗原性を高めるため、多重抗原ペプチド (MAP) 修飾したものも合成した。インフルエンザ血球凝集素ペプチドまたはユビキチン卵白アルブミンペプチドとこれらの配列を融合させたものの、総計 4 種類のデザインを行った。

## 2. 組換え蛋白質(ポリペプチド)の調整

昨年度中に SARS-CoV ゲノムにコードされる蛋白質のうちヒト型抗体産生動物の免疫のための抗原候補として、spike 蛋白質、membrane 蛋白質および nucleocapsid 蛋白質を選択し、それらの組換え蛋白質のデザイン、発現および精製法の確立している (図 4)。本年度はこれらの系を利用して、1 つの蛋白質について精製のタグなどを切り離した純度 95%以上の抗原最終標品として、100mg 規模以上での精製を実施した。

## 3. ヒト型抗体産生マウスにおけるペプチド抗原を用いた免疫実験

デザインしたペプチド抗原を用いてヒト型抗体産生マウスの免疫実験を開始した。最初の試みとして、動物への侵襲性が低く、抗体実用化時により製造承認を得やすい Ribi アジュバントシステムを使用して、1 回 50 $\mu$ g/匹の抗原を複数回投与し、マウスの抗体価上昇を ELISA で検討したが力価上昇をほとんど検出できなかった (結果は示さない)。そこで、よりアジュバント活性が高いと考えられる Freund のアジュバントシステムに切り替えて免疫実験を再試行した。その結果、血清 1000 倍希釈時の ELISA による検討で、S791 エピトープ由来ペプチドにて 5 個体中 4 個体、N エピトープ由来ペプチドで 5 個体中 2 個体で抗体価上昇を得られた。一方 M エピトープ由来ペプチドでは抗体価上昇を確認できなかった。

## 4. ヒト型抗体産生マウスにおけるポリペプチド抗原 (組み換え蛋白質) を用いた免疫実験

ヒト型抗体産生マウスの SARS-CoV 構成因子組み換え蛋白質による免疫：マウスの免疫は最大 6 回実施した (図 5)。1 つの抗原についてマウス個体 5 匹を準備し、それぞれ別個に血清を採取して評価を行った。ELISA による抗血清 1000 倍希釈時の抗体価上昇解析では、準備した組み換え蛋白質 7 種のうち、S2、N は特に良好な免疫原性を持つことが明らかとなった。また S1N、S1C および S791 でもすべての個体で抗体価上昇を認めた。一方、M63 および M116 では抗体価上昇がほとんど得られず、抗原性が低いと考えられた。

5. ウシの免疫実験：一方、準備した SARS-CoV 組み換え蛋白質の抗原性の評価、抗原の投与量の最適化、および使用するアジュバントシステムの選定のため、まずヒト型抗体産生ウシの数十分の 1 の費用で実施可能である野生型ウシへの免疫実験を開始した (図 6)。組み換え蛋白質の性質に応じてアジュバントシステムとして水酸化アルミニウムゲルに吸着後、ISA-25 または TiterMax Gold でエマルジョン化、および Ribi/QuilA システムでエマルジョン化、の 3 通りの投与形態の中から各組み換え蛋白質について 2 形態を選択した。動物実験倫理に関する承認を得た後、平成 17 年 12 月より免疫を開始し、現在まで 4 回目の投与を完了している。

## 5. 得られたヒト型抗体産生マウスおよび通常ウサギの血清の *in vitro* SARS-CoV 中和活性試験

SARS-CoV を Vero E6 細胞に感染させた際のプラーク形成の阻止を指標としてヒト型抗体産生マウス、および通常ウサギで作成した抗血清の中和活性を測定した (図 5)。ウサギの抗血清では、spike 由来蛋白質で数百倍希釈程度の NT50 値が得られた。N 蛋白質に対する抗体は ELISA で非常に高力価であった

が、中和活性は認められなかった。一方、ヒト型抗体産生マウス由来の抗体では、ELISA では抗体価上昇を認めたが、*in vitro* での Vero E6 細胞への SARS-CoV 感染阻止活性を確認することはできなかった。

## 6. SARS 感染迅速診断キットの作成

昨年度同定したペプチドのうち S791 を用いて SARS 感染迅速診断キットの試作を行った。ペプチドのイムノクロマト用マトリックスへの固定化条件の検討の結果、総じてペプチドを C 末端固定した場合に良好な結果が得られた。今回作製したキット試作品での陽性例は 20 例であり、検出感度は 74%となった。

キットの高感度化の取り組みの一貫として S791 を含む組み換え蛋白質を使用したキット試作のための予備試験を行った。Spike 蛋白質をブロットした膜に、S791 ペプチドで免疫したウサギおよび陰性コントロールのウサギより採取した血清を反応させた結果、S791 ペプチドで免疫をしたウサギの血清特異的な Spike との反応性を確認できた。

## 7. SARS 感染症ワクチン開発のための T 細胞エピトープの同定

SARS 感染症に対するペプチドを利用したワクチンの開発、また治療や病態解明への応用を考え、感染患者の液性免疫系に認識される T 細胞エピトープ同定を目的として、本年度は日本人健常人 T 細胞を用いて CTL 誘導実験を行った。前年度実施したペプチドライブラリを用いたスクリーニングの結果を元に、SARS 患者と健常人血清の反応性からペプチドを 4 群に分け、それぞれのペプチドで日本人健常人末梢血を刺激し、細胞性免疫応答をインターフェロン産生、液性免疫応答を蛍光法で側手した。その結果、健常人ではなく SARS 患者血清中にのみ抗体が存在するグループ 2 と名付けた群のペプチドでは健常人リンパ球においてインターフェロン産生などの CTL 反応

の誘導を認めなかった。一方、SARS 患者のみならず健常人の血清にも反応性を示すグループ 4 と名付けた群のペプチドは健常人リンパ球に対して CTL 誘導活性を示した。グループ 4 のうち、74 というペプチドは *Candida albicans* の仮想上の蛋白質と 100%の相同性を示した。このペプチド 74 について、日本人健常人血中に同ペプチドを認識する IgG 抗体および IgA 抗体が存在するかどうかを測定したところ、検討した 11 名の健常人すべてで両クラスの抗体が存在することが明らかとなった。またペプチド 74 で健常人リンパ球を刺激すると、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-2 および IL-10 などの多種類のサイトカインが誘導されることが明らかとなった。

## 8. 中国との研究調整

中国とのサル SARS ウイルス感染実験に関する研究契約の締結のための出張内容をまとめる。

出張件名：中国との SARS に関する研究打ち合わせ

出張期間：平成 18 年 3 月 9～11 日

出張者名：

切替 照雄(国立国際医療センター研究所部長)

趙 吉子(ヒューマンサイエンス財団リサーチレジデント)

石田 功(キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬フロンティア研究所長)

岡崎 寛(キリンビール株式会社医薬カンパニー医企画部ヒト抗体開発担当・部長代理)

中国側参加者：

Dr. Chuau Qin(中国医学科学院 (CAMS) 実験動物研究所・所長)

Dr. Qiang Wei(中国医学科学院 (CAMS) 実験動物研究所・助教授)

Dr. Zhiwei Yang(中国医学科学院 (CAMS) 実験動物研究所・准教授)

出張目的：SARS 治療法の開発研究における中国との共同研究を推進するため、中国医学科学院 (CAMS) 実験動物研究所を訪問し、研究契約締結

のための打ち合わせ、および契約締結を行った。

#### 活動内容：

#### SARS サル感染実験の研究契約締結のための具体的計画立案に関する研究打ち合わせ

中国医学科学院実験動物研究所長 Dr. Chuan Qin らはすでに SARS サル感染実験についていくつかの経験を持っており、今回提示した感染実験およびその後の感染病態の評価の計画を充分実施できることを確認した。

これまで SARS-CoV の動物感染モデルではヒトの病態を反映したモデルの構築が困難であり、その成功例は Dr. Qin 等のグループなどごく僅かである。これは使用する動物種の選択に負うところが大きいと思われる、マカクサル（1-3kg）を積極的に利用可能な CAMS の実験動物研究所は研究契約の締結先として世界でほぼ唯一無二と思われる。本計画ではマカクサルの他、フェレット、イエネコなども加えて SARS のヒトの病態をより反映したモデルの構築も試みる。

その他 SARS 関連の研究として、SARS-CoV の受容体であるヒト型 ACE2 を発現させたトランスジェニックマウスを利用した実験、さらに SARS-CoV の細胞侵入過程を標的とした新薬の安全性試験の可能性も念頭においている。

具体的な共同研究を始めるために、以下のような議論をした。

- ✓ 昨年度の打ち合わせに従い、日本側が作成した研究契約の原案について議論を行い、若干の変更を加えて契約締結に至った。
- ✓ 研究打ち合わせのためにより頻繁に日本側の研究者が中国を訪問すると共に、Dr. Qin を日本に招請する。
- ✓ 実験に必要な経費負担について、ヒューマンサイエンス財団などのご支援をいただき、日本側が負担することとする。
- ✓ 中国医学科学院実験動物研究所は、リーサスサル（1頭 15 万円）10 頭の規模でヒト IgG の SARS 感染防止効果を判定する。
- ✓ 将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

#### D. 考察

#### 1. ペプチドや組み換え蛋白質によるヒト型抗体産生動物や通常動物の免疫実験：

準備したペプチド抗原は免疫源としては Freund のアジュバントシステムを使用しても、ヒト型抗体産生マウスで十分な力価を持った抗体を誘導できなかった。このことはサイズが小さい場合のペプチド抗原の限界を示すものかもしれない。一方、SARS-CoV のポリペプチドである組み換え蛋白質はウサギの免疫実験では *in vitro* 中和活性を持った抗体を誘導できることが明らかとなった。しかしながら同蛋白質をヒト型抗体産生マウスに投与して調整した抗血清は顕著な *in vitro* 中和活性を示さなかった。両者の差異はヒト型抗体産生マウスから得られた抗体がウサギで調整されたものに比べて低力価であったことに起因すると考えられる。現在、ヒト型抗体産生マウスでより高力価の抗体を得るため、組み換え蛋白質の投与時の性状、およびアジュバントシステムの最適化を実施している。これらの知見を現在実施中のウシの免疫実験にもフィードバックしていく予定である。

#### 2. 作成された抗体による *in vitro* SARS-CoV 中和試験：

本計画の根幹の 1 つである中和抗体の機能性評価のための SARS-CoV の *in vitro* 中和試験の測定系の改善を行い、中和抗体候補の評価を実施できた。ヒト型抗体産生マウスで作成した中和抗体候補では明瞭な中和活性を確認できなかったため、免疫条件の検討が必要と思われる。

#### 3-1 SARS 感染迅速診断キットの試作：

最終的に得られたキットは SARS 患者血清の約 70% で陽性となり、一定の検出感度を持った検出感度のキットの作成に成功したと考えられる。一方、判定者による判定結果でばらつきがあること、またキットの保存期間（有効期間）、といった改善すべき問題点も明らかになっている。これらの問題点の一部は



キットのさらなる高感度化により解消出来る可能性が高い。キット高感度化の取り組みの1つとして本年度は S791 部分を含む組み換え蛋白質を使用したキット作成のための予備的試験にも着手している。ウサギで調整した S791 ペプチドに対する抗体は良好な反応性を示しており、今後はペプチドを使用したキットと比較しながら、特異性、感度、コストなどの観点からより良い検査法を検討する。

### 3-2. SARS 感染症ワクチン開発のための T 細胞エピソードの同定：

SARS-CoV のオーバーラップペプチドで日本人健康人リンパ球を刺激した結果、74 番のペプチドで T 細胞誘導能を確認できた。ワクチン等への応用のためにはヒト組織などとの交差反応性が問題となる。同ペプチドを含め、SARS ウイルス構成蛋白質の HLA 拘束性ペプチドの特異性や交差反応性の検討を行い、より特異性の高いペプチドを選別する必要がある。

### 4. 中国におけるサル感染実験の実施について：

中国医学科学院実験動物研究所は、中国政府が認定した感染実験を実施するために、北京市に設立された、非常に安全な施設であり、昨年度来の打ち合わせ・交流を通じて、中国医学科学院実験動物研究所共同研究において SARS サル感染実験実施のための研究契約を締結できた。研究開始は来年度初頭を予定している。

また、将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

## E. 結論

SARS ウイルスの感染防御、感染後の SARS 発症予防、さらに SARS 発症後の重症化予防と治療を目指した、ヒト型ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発研究において、本年度は、抗原ペプチド、組換え蛋白質の抗原性の評価、抗体中和活性試験の確立、迅速診断キットの試作、中国との研究契

約締結を実施し、大きな進展があった。

## 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: Kawana A, Teruya K, Hama T, Kuroda E, Sekiguchi J, Kirikae T, Naka G, Kimura S, Kuratsuji T, Ohara H, Kudo K. Trial surveillance of cases with acute respiratory symptoms at IMCJ Hospital. *Jpn J Infect Dis.* 2005 Aug;58(4):241-3.
- 2: Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phi NC, Van Ban V, Ha LE, Long HT, Yanai H, Keicho N, Kirikae T, Sasazuki T, Anderson RM. Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jul;73(1):17-25.
- 3: Itoyama S, Keicho N, Hijikata M, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha le D, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T. Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. *Am J Med Genet A.* 2005 136(1):52-7.
- 4: Hamano E, Hijikata M, Itoyama S, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha le D, Ban VV, 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.* 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)

1: 倉辻忠俊, 切替照雄. 【広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査 その数値をどう読むか】 免疫学的検査 ウイルス感染症関連検査(抗原および抗体を含む) SARS コロナウイルス(解説). 日本臨床(0047-1852)63 巻増刊7号 Page343-345

2: 切替照雄. 【エビデンスに基づいた ICT のための感染対策トレーニングブック】 感染対策の最新情報をチェックしよう! 病院感染対策関連法規(解説/特集). INFECTION CONTROL(0919-1011)2005 年秋季増刊号 Page244-251(2005. 11) 1-4. 論文発表 (著書)

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)

1: 濱野栄美, 土方美奈子, QuyTran, PhiNguyen Chi, LongHoang Thuy, HaLe Dang, BanVo Van, 糸山智, 松下育美, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)と抗ウイルス蛋白 MxA, OAS1 遺伝子多型の関連解析. 日本臨床分子医学会 42 回学術総会プログラム・抄録集 Page119(2005. 07)

2: 濱野栄美, 土方美奈子, QuyTran, PhiNguyen Chi, LongHoang Thuy, HaLe Dang, BanVo Van, 糸山智, 松下育美, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)と抗ウイルス蛋白 MxA, OAS1 遺伝子多型の関連解析. 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)43 巻増刊号 Page250(2005. 04)

3: 糸山智, TranQuy, NguyenPhi Chi, HoangLong

T., LeHa D., VoBan 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. 呼吸器疾患と遺伝子多型

Angiotensin converting enzyme 1(ACE 1)の遺伝的多型と Severe acute respiratory syndrome(SARS)の重症化. 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)43 巻増刊号 Page54(2005. 04)

4: 濱敏弘, 川名明彦, 照屋勝治, 國方徹也, 枝元良広, 佐藤守仁, 黒田恵美, 堀井久美, 小野瀬友子, 吉田メイ子, 此崎寿美, 永野哲史, 関口純一朗, 切替照雄. 急性呼吸器症状サーベイランスの試み. 環境感染(0918-3337)20 巻 Suppl. 号 Page139(2005. 02)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得)

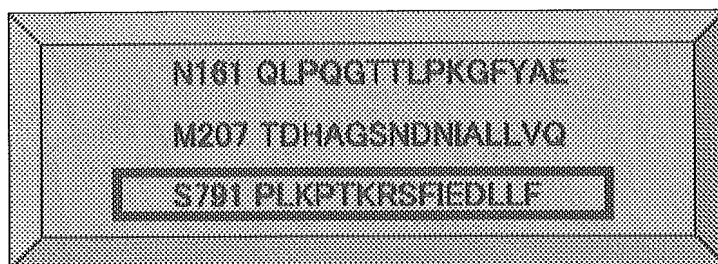
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図 1



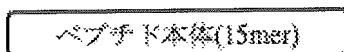
To determine highly immunogenic severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) epitope peptides capable of inducing long-lasting immunity, we tested for their reactivity of these 197 peptides to patients' sera (n=78) at 6 months post-infection. The significantly higher levels of IgG antibodies specific to three (S791, M207, and N161) of 42 peptides were detectable in the post-infection sera from 43 (55%), 38 (49%), or 34 (44%) of 78 patients, respectively. These three peptides recognized by their long-lasting immunity may provide a better understanding of the immunogenicity of SARS-CoV.

Shiehijo, S., et. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

図 2

## ペプチド抗原の構成

### 1. ペプチドのみ



### 2. MHC class II結合断片融合型



### 3. MAPペプチド型

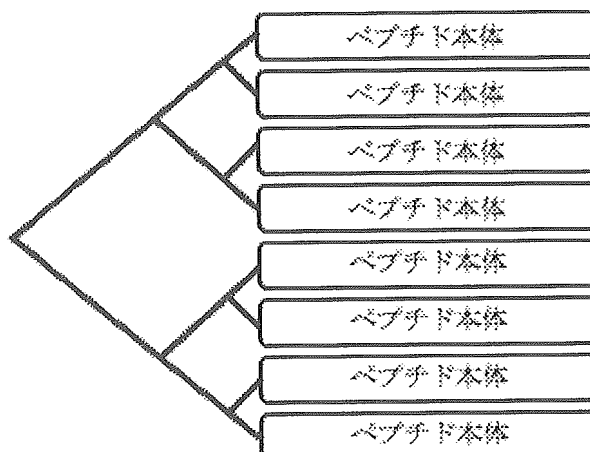




図 5

## 生物活性測定

### インビトロ中和活性

東京医科歯科大学山本教授、吉仲助教授の指導で実施

	S1-N	S1-C	S791	S-mix	N	M63
ウサギ ELISA	>10,000	>10,000	>10,000	ND	>10,000	>10,000
ウサギNT <sub>50</sub>	800	30	1600	800	<20	<20
KM ELISA	1000	1000	1000	ND	1000	ND
KM NT <sub>50</sub>	<20	<20	<20	<20	<20	ND

注) NT50: 50%ブランク減を生じる血清希釈倍率。 ELISA: 検出できた血清希釈倍率。  
ND: not done.

### インビボ活性

・中国医科学院(CAMS)実験動物研究所所長 Dr. Chuan Qin  
に委託研究開始のため、3月9日に訪中予定

図 6

## ウシ免疫実験

- ・米国Hematech社 (05年7月キリンが買収)で実施。
- ・アジュバンドを含めた予備実験を通常ウシで実施。(通常ウシ700\$/頭: TCウシ25000\$/頭)
- ・ウシコロナウイルス感染の可能性があるので、SARS抗原に低反応性の個体を予め選択。

### アジュバンド選択

- ①可溶化抗原 (PBS or Urea)→Aluminum hydrogelに100%吸着→ISA-25エマルジョン化  
可溶化抗原 (PBS or Urea)→Aluminum hydrogelに<100%吸着→TiterMax Goldエマルジョン化
- ②可溶化抗原 (PBS or Urea)→Ribi/QuilAエマルジョン化

Group #	Adjuvant 1						Adjuvant 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Antigen	N	S1-C	S1-N	S2	S791	M116	N	S1-C	S1-N	S2	S791	M116
Adjuvant	Al(OH) <sub>3</sub> ISA-25	TiterMax Gold	TiterMax Gold	Al(OH) <sub>3</sub> ISA-25	TiterMax Gold	TiterMax Gold	Ribi /Quil A	Ribi /Quil A	Ribi /Quil A	Ribi /Quil A	Ribi /Quil A	Ribi /Quil A
V1	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg
V2	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg
V3-6	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg

注) IACUC申請(動物実験倫理に関する承認)後、実験を開始した。

研究要旨

本研究全体の目標は、SARS ウイルスの感染防御、感染後の SARS 発症予防、さらに SARS 発症後の重症化予防と治療を目指して、ヒト型ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発を行うことである。これらの研究遂行に当たっては、サルなど SARS ウイルス感染モデル実験等の経験がある中国研究施設との共同研究を実施することが必要である。分担研究者は、本研究を通じて中国科学院及び中国医学科学院との研究グループを組織した。本年度は中国側とサル SARS ウイルス感染実験に関する研究契約を締結した。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は、その致死率の高さ（約10%）、superspreaderの存在などから、人間活動の国際化と相まって、一地方病としてではなく、I類の国際感染症として各地域・国の経済にも多大の影響を及ぼした。

医師・看護師、臨床検査技師などは常に感染の危険にさらされており、いったん患者が発生すると、これら、医療従事者のみならず、一般国民の感染予防・発症予防・重症化予防と治療法の確立は国際的な急務である。

本研究においては、SARS ウイルス感染予防、感染後の発症予防、発症後の重症化予防と治療法確立を目的とし、ヒト型ウシを用いたヒト型中和抗体の開発を目指す。

開発に当たっては、SARS ウイルス感染サルなど実験モデル動物を用いて感染予防、発症予防に寄与する抗体を決定することが不可欠である。そのためには、この分野で先進的な中国の研究者との共同研究が必要となる。本研究では、昨年度に実施した分担研究者らと中国の専門家による日中 SARS シンポジウムや共同会議などを通じて、頻繁に意見交換をした結果、日中共同研究によるサル SARS ウイルス感

染実験に関する研究契約を締結できる段階になってきており、その締結に向けて本年度も訪中を実施した。

B. 研究方法

昨年度7月に中国・北京にて開催された「新興再興感染症制圧のための共同戦略会議（北京）」に笹月等が出席し、中国に滞在して、中国医学科学院（CAMS）実験動物研究所、中国科学院生物物理研究所、清華大学理学部及び中国医学科学院中国协和医科大学の研究者と共同研究の可能性を話し合った。これらの研究者とは平成17年3月10～11日「新興・再興感染症シンポジウム（東京）」の際も共同研究に関する話し合いを行った。

これらの話し合いを基に、日本の共同研究者である切替照雄（国立国際医療センター）や石田功（キリンビール株式会社医薬カンパニーフロンティア研究所）を中国に派遣し、具体的なサル SARS ウイルス感染実験に関する共同研究契約に関する準備を実施してきた。

C. 研究結果

中国とのサル SARS ウイルス感染実験に関する研

究契約の締結のための出張内容をまとめる。

出張件名：中国との SARS に関する研究打ち合わせ

出張期間：平成 18 年 3 月 9 ～ 11 日

出張者名：

切替 照雄(国立国際医療センター研究所部長)

趙 吉子(ヒューマンサイエンス財団リサーチレジ  
デント)

石田 功(キリンビール株式会社医薬カンパニー医  
薬フロンティア研究所長)

岡崎 寛(キリンビール株式会社医薬カンパニー医  
企画部ヒト抗体開発担当・部長代理)

中国側参加者：

Dr. Chuau Qin(中国医学科学院 ( CAMS ) 実験動物  
研究所・所長)

Dr. Qiang Wei(中国医学科学院 ( CAMS ) 実験動物  
研究所・助教授)

Dr. Zhiwei Yang(中国医学科学院 ( CAMS ) 実験動  
物研究所・准教授)

Dr. Zhang

出張目的： SARS 治療法の開発研究における中国と  
の共同研究を推進するため、中国医学科学院  
( CAMS ) 実験動物研究所を訪問し、研究契約締結  
のための打ち合わせ、および契約締結を行った。

#### 活動内容：

##### SARS サル感染実験の研究契約締結のための具体的計 画立案に関する研究打合わせ

中国医学科学院実験動物研究所長 Dr. Chuan Qin  
らはすでに SARS サル感染実験についていくつかの  
経験を持っており、今回提示した感染実験およびそ  
の後の感染病態の評価の計画(添付文書 1)を充分  
実施できることを確認した。

中国医学科学院実験動物研究所は、中国政府が認  
定した感染実験を実施するために、北京市に設立さ  
れた、地下 1 階、地上 5 階の建物、職員 195 名うち  
研究員 20 名を擁する研究所で、中国では SARS の感  
染実験ができる唯一の動物施設である。1994 年から、  
P3 感染実験を実施しており、SARS も含めてこれま  
でに実験室内での人への感染事故はない。P3 感染実  
験室は 3 室あり、サルなどの大動物 2 実験室、マウ

スなどの小動物 1 実験室からなっている。通常は、  
SARS の他に、結核や HIV の感染実験も実施している。  
大動物用の実験室は、通常 1 実験室あたり 100 匹規  
模の実験が可能であるが、SARS の実験では、1 実験  
室あたり 30 ～ 32 頭の実験が実施可能である。なお、  
感染実験では、それぞれのケージが独立した空調シ  
ステムで管理されている ( IVC: isolated  
ventilation cage ) 。

これまで SARS-CoV の動物感染モデルではヒトの  
病態を反映したモデルの構築が困難であり、その成  
功例は Dr. Qin 等のグループなどごく僅かである。  
これは使用する動物種の選択に負うところが大きい  
と思われ、マカクサル ( 1-3kg ) を積極的に利用可  
能な CAMS の実験動物研究所は研究契約の締結先と  
して世界でほぼ唯一無二と思われる。本計画ではマ  
カクサルの他、フェレット、イエネコなども加えて  
SARS のヒトの病態をより反映したモデルの構築も試  
みる。

打ち合わせにおいては、石田はヒト型抗体産生マ  
ウス・ヒト型抗体産生ウシの開発状況・その有望性  
について、また切替はヒト型抗体産生動物の免疫に  
使用するための SARS-CoV 構成因子の組み換え蛋白  
質や対応ペプチドの作成状況、さらにそれらを用い  
たヒト型抗体産生マウスおよび通常のウサギなどの  
免疫実験の成果(石田および切替の項を参照)を提  
示し、それらの進捗状況について中国側に説明を行  
った。

その他 SARS 関連の研究として、SARS-CoV の受容  
体であるヒト型 ACE2 を発現させたトランスジェニ  
ックマウスを利用した実験、さらに SARS-CoV の細  
胞侵入過程を標的とした新薬の安全性試験の可能性  
も念頭においている。

具体的な共同研究を始めるために、以下のような  
議論をした。

- ✓ 昨年度の打ち合わせに従い、日本側が作成した  
研究契約の原案について議論を行い、若干の変  
更を加えて契約締結に至った。
- ✓ 研究打ち合わせのためにより頻繁に日本側の研  
究者が中国を訪問すると共に、Dr. Qin を日本  
に招請する。

- ✓ 実験に必要な経費負担について、ヒューマンサイエンス財団などのご支援をいただき、日本側が負担することとする。
- ✓ 中国医学科学院実験動物研究所は、リーサスサル（1頭15万円）10頭の規模でヒトIgGのSARS感染防止効果を判定する。
- ✓ 将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

#### D. 考察

中国医学科学院実験動物研究所は、中国政府が認定した感染実験を実施するために、北京市に設立された、非常に安全な施設であり、昨年度来の打ち合わせ・交流を通じて、中国医学科学院実験動物研究所共同研究においてSARSサル感染実験実施のための研究契約を締結できた。研究開始は来年度初頭を予定している。

また、将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

#### E. 結論

中国医学科学院実験動物研究所長らとSARSサル感染実験研究契約を締結し、実験開始へ大きく前進することができた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 原著論文

- 1: Shi SQ, Peng JP, Li YC, Qin C, Liang GD, Xu L, Yang Y, Wang JL, Sun QH. The expression of membrane protein augments the specific responses induced by SARS-CoV nucleocapsid DNA immunization. *Mol Immunol*. 2006 43(11):1791-8.
- 2: Zhang J, Liu Y, Hu L, Gao Q, Zhang Z, Zhang X, Chen J, Gong X, Song L, Liu Y, Li J, Li S,

Huang J, Ning Y, Gao H, Qin C, Dong X, Wei J, Dong G, Yin W. Preparation and characterization of SARS in-house reference antiserum.

*Vaccine*. 2005 23(48-49):5666-9.

3: Gao H, Zhang LL, Wei Q, Duan ZJ, Tu XM, Yu ZA, Deng W, Zhang LP, Bao LL, Zhang B, Tong W, Hou YD, Zhang BL, Huang L, Qin C. [Preventive and therapeutic effects of recombinant IFN-alpha2b nasal spray on SARS-CoV infection in *Macaca mulata*]

*Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2005 19(3):207-10.

4: Zhang JS, Chen JT, Liu YX, Zhang ZS, Gao H, Liu Y, Wang X, Ning Y, Liu YF, Gao Q, Xu JG, Qin C, Dong XP, Yin WD. A serological survey on neutralizing antibody titer of SARS convalescent sera. *J Med Virol*. 2005 77(2):147-50.

5: Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, Xu J, Liu Y, Zheng BJ, Woodle MC, Zhong N, Lu PY. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med*. 2005 11(9):944-51.

6: Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005 11(8):875-9.

7: Qin C, Wang J, Wei Q, She M, Marasco WA, Jiang H, Tu X, Zhu H, Ren L, Gao H, Guo L, Huang L, Yang R, Cong Z, Guo L, Wang Y, Liu Y, Sun Y, Duan S, Qu J, Chen L, Tong W, Ruan L,



Liu P, Zhang H, Zhang J, Zhang H, Liu D, Liu Q, Hong T, He W. An animal model of SARS produced by infection of *Macaca mulatta* with SARS coronavirus. *J Pathol.* 2005 206(3):251-9.

8: Chen Z, Zhang L, Qin C, Ba L, Yi CE, Zhang F, Wei Q, He T, Yu W, Yu J, Gao H, Tu X, Gettie A, Farzan M, Yuen KY, Ho DD. Recombinant modified vaccinia virus Ankara

expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region.

*J Virol.* 79(5):2678-88.

H. 知的財産権の出願・登録状況：無し

## PROTOCOL

### “Pathological and Immunological Analysis of SARS infection in Monkeys”

- Study Facility: Institute of Laboratory Animal Science  
Chinese Academy of Medical Sciences
- Study Director: Dr. Chuan Qin, Chief Director, Institute of Laboratory Animal Science,  
Chinese Academy of Medical Sciences, Chao Yang district No.5 Panjia Yuan  
Nan Li, Beijing, China
- Research Associate: Teruo Kirikae, M.D.  
Director  
Department of Infectious Diseases,  
The Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama,  
Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

#### 1. OBJECTIVE:

SARS is a newly emerging and highly communicable infectious disease of humans that was first detected in South China in November 2002 and then spread globally. Much has been learned about this syndrome, including the epidemiology and transmissibility of SARS-CoV infections and the clinical manifestations of disease. Resurgence of SARS remains a distinct possibility in the post-outbreak period. There is therefore an urgent need to establish a reliable animal model for understanding the pathogenesis of SARS-CoV infection and for developing vaccines and antiviral drugs for the prevention and treatment of SARS.

#### 2. STUDY DESIGN:

Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), ferrets (*Mustela furo*), and domestic cats (*Felis domesticus*) are susceptible to infection by SARS-CoV. Replication of SARS-CoV in the respiratory tract of mice has also been recently demonstrated. However, the long-term sequelae of SARS-CoV infection with respect to progression of the histopathological changes, the degree of immunological reaction, and the duration of virus replication in these animal models are largely unknown. Given the importance of developing a non-human primate model for elucidating the pathophysiological mechanisms of lung injury and developing new treatments for SARS, we investigated

the susceptibility of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) to SARS-CoV infection through nasal cavity inoculation. The pathological changes in lungs and other organs after SARS-CoV-inoculation, the replication and excretion of SARS-CoV *in vivo*, and the immune response specific for SARS-CoV in all macaques were studied at different times after virus infection. In this project, we will do the molecular detection of SARS-CoV replication *in vivo*, the timing of seroconversion and development of neutralizing antibody response, and the dynamic pathological changes in the lungs of infected animals over a 60-day period.

### 3. TECHNICAL PROCEDURES:

All macaques, aged 1-3 years, will be obtained from the Institute of Medical Biology (Kunming, China). The experiments will be performed in BL-3 level laboratories exclusively assigned for SCV research at the Institute of Laboratory Animal Science of CAMS, with an animal study protocol approved by the Institutional Animal Welfare Committee. The autopsy findings of human SARS patients, monkeys prepared for this experiment will be examined on the fifth, tenth, 15th, 20th, 30th, and 60th day post-infection, with the study design focusing on the behaviour of the acute inflammatory response after virus infection. In addition, the possibility of complications such as emphysema, proliferation of fibrous tissue, lung fibrosis, and pleural adhesion at the later stages (60 days) of infection will be examined.

SARS-CoV strain PUMC01 was isolated from a SARS patient in China and cultured with Vero-E6 cells (Genebank accession No AY350 750). The 11th passage virus will be used.

The animals will be subjected to daily measurement of anal temperature, routine blood assays, and chest radiography.

The pharyngeal swab samples will be collected from infected monkeys from the first day after inoculation and be tested for SARS-CoV by nested RT-PCR.

Autopsies will be performed in the biosafety level 3 (BSL3) animal laboratory at different intervals after infection. Organs will be grossly examined and tissue blocks will be taken from the lungs, hilar lymph nodes, heart, liver, kidneys, intestines, adrenals, thymus, mesentery lymph nodes, and brains. Haematoxylin and eosin (H&E) stain, Verhoeff's stain, periodic acid-Schiff (PAS) stain, Mallory's connective tissue (MCT) stain, phosphotungstic acid haematoxylin (PTHA), and Gomori's stains will be used to identify changes in collagen fibres, elastic and reticulin fibres, alveolar lining cells, hyaline membranes, and mucus in the alveolar spaces. Sections will be also stained with monoclonal antibodies (MAbs) for cytokeratin, CD68, and CD35 to identify the origin of different types of macrophages in alveoli and in inter-alveolar septa at different times after virus inoculation. MAbs against CD4 and CD8 will be used for T-lymphocyte subset identification.

SARS-CoV antigens will be detected in various tissues by immunohistochemical

staining. Duplicate sections of all tissue samples were stained using an avidin-biotin complex peroxidase technique.

Samples of lung, spleen, and lymph node will be fixed in 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde, and post-fixed in 1% osmium tetroxide. Tissue samples will be embedded in epoxy resin Epon812. Thin sections were doubly stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Tecnai 12 (FEI) transmission electron microscope.

#### 4. REPORT:

The Final Report on “Pathological and Immunological Analysis of SARS infection in Monkeys” should be submitted to the sponsor through the research associate by April 5, 2005.