

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

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

分担研究者 分担研究者 七條 茂樹 久留米大学医学部助教授

研究要旨

長期間免疫応答が持続する SARS コロナウイルス (CoV) 感染患者抗体により認識される SARS ウイルスの構造蛋白質エピトープを利用して、中和活性に関与するエピトープを同定することを目的に、昨年度は、SARS 患者血清により認識される S791, M207 および N161 の 3 種類のエピトープを同定した。

ワクチン開発の可能性を検討するために、患者血清中抗体により認識される HLA-A2 および HLA-A24 拘束性 T 細胞中和抗体エピトープを同定する目的で、日本人健常者 T 細胞を用いて CTL 誘導実験を行い、CTL 誘導性ペプチドの同定に成功した。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（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。

本研究全体としては、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。

本分担研究では、昨年度、ヒト型中和抗体の標的となるようなウイルス抗原の同定を目的として、SARS ウイルスゲノムにコードされた 15 種のタンパクのうち、spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E)の全領域に対応する各ペプチドが 15 アミノ酸からなるオーバーラップペプチドライブラリを合成し、これを用いて、SARS 患者血清と反応する多数の抗原エピトープの同定を実施し、S791, M207 および N161 の 3 つのペプチドをキット作成のための標的配列として絞り込んだ。本年度はこれらの配列を利用して、感染 6 か月後でも検出が可能な長期間免疫応答が持続する SARS 感染患者抗体を検出した。

さらに、本分担研究では SARS 感染症に対するペ

プチドを利用したワクチンの開発、また病態機構解明および診断のため、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、日本人健常人 T 細胞を用いて CTL 誘導実験を行った。

B. 研究方法

SARS 感染症に対するペプチドを利用したワクチンの開発のため、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、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。

(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って採血して研究に供している。

C. 研究結果

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。グループ 2 のペプチドはマウス肝炎ウイルスにコードされる因子と 100%の相同性を持つものだった。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- α 、GM-CSF、IL-6、IL-1 β 、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。

D. 考察

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-CoV 遺伝子の核酸配列や、この遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列の相同性を検索すると、bovin corona virus、poachin epidemic diarrhoea virus、murine hepatitis virus、transmissible gastroenteritis virus、avian infectious bronchitis virus、など多くのウイルスが該当する。実際、各種 SARS-CoV 由来オーバーラップペプチドに対する抗体を測定した場合も、ペプチドによっては健常人でも高頻度に検出される場合があった。これらの知見を踏まえ、SARS-CoV のオーバーラップペプチドで日本人健常人リンパ球を刺激した結果、74 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。

E. 結論

ワクチン開発可能性を検討するため、患者血清中抗体により認識される HLA-A2 および HLA-A24 拘束性 T 細胞中和抗体エピトープを同定する目的で、日本人健常人 T 細胞を用いて CTL 誘導実験を行い、CTL 誘導性ペプチドの同定に成功した。

これらの研究のためには感染発生地域の患者血清やリンパ球を使用することが不可欠であり、現地研究機関との共同研究を実現する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

3. その他

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)

1. 田中将博(久留米大学 医・免疫), 室谷健太, 峯孝志, 小松誠和, 七條茂樹, 柳川高, 伊東恭悟
抗ペプチド抗体価測定による膵臓癌診断の検討.
日本免疫学会総会・学術集会記録(0919-1984)35 巻
Page82
2. 田中将博(久留米大学 医・免疫), 小松誠和, 七條茂樹, 伊東恭悟. ペプチド抗体価測定による膵臓癌診断の検討. 日本免疫学会総会・学術集会記録(0919-1984)34 巻 Page264(2004. 11)
3. 峯孝志(久留米大学 医学部免疫学), 山田亮, 七條茂樹, 山名秀明, 佐藤裕二, 野口正典, 植村天受, 山中龍也, 藤原俊義, 柳本泰明, 伊東恭悟.
がん免疫療法臨床試験の展開 テーラーメイドペプチドワクチン. 基盤的癌免疫研究会 9 回総会抄録 Page32(2005. 06)

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

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のため、ヒト型抗体産生ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発である。本年度は昨年中に確立した SARS-CoV 中和試験の試験法を改良を加えた上で、SARS-CoV の各因子を標的として調整された抗体の中和活性を測定した。ウサギを用いた一般的な免疫により得た抗体は中和活性を示した。一方、ヒト型抗体産生マウスの免疫により得た抗体は力価が不十分であり、免疫法の改良の必要性があると考えられた。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は、SARS-CoV を原因ウイルスとする致死率が約 10 %にも及ぶ感染症である。2002 年から 2003 年にかけて、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・国の経済に多大な影響を及ぼしたことは記憶に新しい。SARS の疫学調査などデータから医師・看護師、臨床検査技師などの医療従事者は SARS 患者やその検体への接触時に常に感染の危険にさらされていることが明らかにされている。またいわゆるスーパースプレッダーの存在から、いったん患者が発生すると、医療従事者のみならず、一般国民も感染リスクを負うこととなり、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。

本分担研究では本計画で作成されるヒト型中和抗体の検定の一環となり、その実用性評価に重要である *in vitro* での SARS-CoV 中和試験を行う。本年度は昨年度報告した SARS-CoV 感受性細胞を用いたウイルス感染後の細胞傷害効果 (Cytopathic effect,

CPE) を指標とする試験法に方法に変更を加え、より定量的な系を確立した。

B. 研究方法

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。昨年度は、ウイルス感染後、毎日 CPE の出現の有無、細胞の性状を観察する形式の測定法を構築した。本年度は Vero E6 細胞へのウイルス付着操作後、メチルセルロースを添加してウイルス拡散を抑制し、2 日間の培養後に細胞を染色することで、ウイルスの感染効率をプラーク数として計数可能な、より定量的な測定系とした。

C. 研究結果

以下に今回、確立した中和試験法を示す。

- 1) 予め 24 ウエルマイクロプレートに Vero E6 細胞が単層になるように細胞増殖培地で培養しておく。
- 2) 検体（抗血清など）を適当と思われる倍率で DMEM などに希釈した溶液を 100 μ l 調整する。
- 3) 同溶液に予め 200 PFU/50 μ l となるように調整した SARS-CoV 液の 100 μ l を添加し、37 $^{\circ}$ C で 45 分間インキュベートする。
- 4) 1) の細胞単層培養に、3) の混合液を重層し、37 $^{\circ}$ C で 45 分間インキュベートして細胞にウイ

ルスを付着させる。

5) 2% FCS および 1% メチルセルロースを含む DMEM を 500 μ l 重層し、37°C、5%二酸化炭素で、2 日間培養する。

6) 20%ホルマリンの 500 μ l を添加し、室温で 1 時間放置する。

7) ホルマリンを除去し、紫外線照射を行う。

8) クリスタル紫溶液を添加し、数分間染色後、PBS で洗浄する。

9) プラーク数を計数する。

表 1 には本法による、ヒト型抗体産生マウスおよびウサギにて作成した SARS-CoV 因子に対する抗血清の *in vitro* 中和活性測定の結果を示す。ヒト型抗体産生マウスに SARS-CoV の構成因子の組み換え蛋白質、またはそれらの内部に見いだされた SARS 回復患者の血清反応性のエピトープに対応するペプチドを抗原として免疫を行ったヒト型抗体産生マウスおよび通常のウサギから回収された血清は、免疫に用いた抗原には ELISA での解析で一定の反応性を示したにもかかわらず、顕著な中和活性を認めることはできなかった。結果は示さないがウサギに組み換え蛋白質を免疫することで得られた抗体には希釈倍率 100 倍程度での中和活性を確認している。

D. 考察

本法は簡便ながらウイルス中和試験の標準法として使用されている手法を用いた信頼性の高い方法である。昨年度報告した CPE 観察を主眼とする測定法では、検体の種類によって接種後に細胞毒性による細胞の変化が起こることがあるので、CPE と混同しないように注意する必要があること、および Vero E6 細胞に SARS-CoV (moi of >1.0) を感染させた場合には一旦 CPE が出現し始めると、その進行は比較的早いこと、といった注意を要する点があることが知られている。今回報告した改良法では、ウイル

ス移動を制限することで、より定量性・再現性を高めることができた。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1: 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. 2005 102(35):12543-7.

2: 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. 2005 58(2):88-94.

3: 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. 2005
125(2):181-6.
4: Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S,
Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y,
Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H,
Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K,
Matsumoto M, Kase T, Demello DE, Peiris JS,
Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T,

Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.
The development of vaccines against SARS
corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice.
Vaccine. 2005 23(17-18):2269-72.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

表1 ヒト型抗体産生マウスおよびウサギで調整した中和抗体候補血清の *in vitro* での SARS-CoV 中和試験

検体*		ブランク数					判定
抗原	免疫動物	希釈	well 1	well 2	平均		
S1N	ヒト型抗体産生マウス	1:50	63	54	58.5	陰性	
S1C	ヒト型抗体産生マウス	1:50	71	60	65.5	陰性	
S791	ヒト型抗体産生マウス	1:50	68	93	80.5	陰性	
S2	ヒト型抗体産生マウス	1:50	67	73	70	陰性	
S-peptide	ヒト型抗体産生マウス	1:50	99	79	89	陰性	
N	ヒト型抗体産生マウス	1:50	85	89	87	陰性	
N-peptide	ヒト型抗体産生マウス	1:50	70	58	64	陰性	
アジュバントのみ	ヒト型抗体産生マウス	1:50	57	55	56	陰性	
S-peptide	ウサギ	1:50	103	120	111.5	陰性	
N-peptide	ウサギ	1:50	125	118	121.5	陰性	
M-peptide	ウサギ	1:50	80	82	81	陰性	
M	ウサギ	1:50	59	49	54	陰性	
アジュバントのみ	ウサギ	1:50	92	96	94	47	
無添加	-	-	115	108	111.5	56	
anti-SARS-CoV rabbit serum	ウサギ	1:20000	0	1	0.5	陽性	

*抗原の詳細は切替の項を参照されたい。

分担研究報告書

ヒト型ウシを用いたヒト型抗体の作成

分担研究者 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

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のため、ヒト型抗体産生ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発である。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、発現および精製法を確立した。本年度はこれらの蛋白質を用いてヒト型抗体産生マウスおよび通常のウサギの免疫実験を行い、これらの組み換え蛋白質の抗原性、および得られた抗血清の *in vitro* での SARS-CoV の中和活性試験を実施した。またウシを用いた免疫実験に十分な抗原を準備可能となったので、野生型ウシを用いた免疫実験を開始した。ヒト型抗体産生マウスおよび通常ウサギとも投与抗原を使用した ELISA による抗体価評価では、希釈倍率 1000-10000 倍程度でも検出可能な抗血清の力価を得ることができたが、*in vitro* SARS-CoV 中和試験では、ヒト型抗体産生マウスから得られた抗体では十分な中和活性を得ることが出来なかった。従って、ヒト型抗体産生マウスへの抗原投与方法を検討し、十分な力価を持った抗体を得ることが必要と考えられる。

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。そこで本研究においては、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、ヒト型抗体ウシを用いたヒト型中和抗体の開発を目指す。

本分担研究では SARS-CoV 蛋白質の組換え蛋白質を抗原としたヒト型抗体産生動物の免疫を計画しており、昨年度は抗原の調整のため、SARS-CoV 蛋白質

からの抗原候補の選択、その設計、大量発現系の構築、精製法の確立の検討を実施した。本年度は昨年度確立した組み換え蛋白質精製系より得られた組み換え蛋白質を用いて、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を実施し、調整した抗原の免疫原性および免疫方法の検討を行った。またヒト型抗体産生ウシの作出についてもさらに検討を進めた。図1に示したようにヒト型抗体産生マウスである KM マウスはキリン医薬カンパニーと米国 Medarex 社の提携により作出されたヒト型抗体のみを産生するマウスである。一方、図2、3に示したように、キリン医薬カンパニーはキリン社の子会社となった米国 Hematech 社にて、ヒト染色体導入技術によるヒト型抗体産生ウシの開発を行っている（文献6）。本計画ではこれらのヒト型抗体産生動物を利用して SARS-CoV 中和ヒト型抗体の開発を実施する。

B. 研究方法

1. 大腸菌発現系を利用した各種 SARS-CoV 組み換え蛋白質作成：昨年度中に図 4 に示した SARS-CoV 構成因子の各組換え蛋白質発現・精製系の構築を完了している。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用のタグなどを切り離れた純度 95%以上の抗原最終標品として、100mg 規模以上の精製を実施した。

2. ヒト型抗体産生マウスおよび通常ウサギの免疫：ヒト型抗体産生マウスは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 μ g/匹の抗原を 1 回目のみ皮下と腹腔、2 回目以降は腹腔のみに投与した。通常ウサギの免疫は Freund のアジュバントシステムを使用し、1 回 100 μ g/匹の抗原を背部皮下に投与した（図 5）。

3. ELISA による抗体価変動の評価：ELISA プレートに抗原とした蛋白質を直接固相化し、これに反応する抗体量を、抗ヒト抗体または抗ウサギ抗体を二次抗体として検出した。

4. *in vitro*での SARS-CoV 中和試験：田代の項の方法で中和試験を実施した。培養期間は 6-8 日間として、血清を順次希釈し、プラーク数が 50%となる点 (NT50) を決定して血清の中和力価とした。

C. 研究結果

1. 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。

2. 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、4 回目の投与を完了している。

3. 得られた各抗血清の *in vitro* SARS-CoV 中和活性測定：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 7）。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。一方、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。

D. 考察

準備した SARS-CoV の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。一方、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。

E. 結論

一連の検討で、標的とした蛋白質の抗原準備をウシを用いた免疫実験に対応する 100mg 規模で完了した。これらの抗原を使用したヒト型抗体産生マウスでの免疫実験から、より高力価の抗体を得るための検討が必要なことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1: Hiki Y, Takahashi K, Itoh M, Inoue K, Horie A, Tomita M, Murakami K, Hasegawa M, Nabeshima K, Kushimoto H, Ishida I, Iwase H, Sugiyama S. Continuous administration of human desialo-degalacto IgA1 causes mesangial IgA deposition in KM mouse having entire human Ig loci. *Nephrology (Carlton)*. 2005 10 Suppl 6:A430.

2: Kuroki M, Yamada H, Shibaguchi H, Hachimine K, Hirose Y, Kinugasa T, Ishida I, Kuroki M. Preparation of human IgG and IgM monoclonal antibodies for MK-1/Ep-CAM by using human immunoglobulin gene-transferred mouse and gene cloning of their variable regions. *Anticancer Res*. 2005 25(6A):3733-9.

3: Takauchi A, Kobayashi T, Tahara T, Nakazawa K, Hayakawa M, Shibata Y, Ishida I, Abiko Y, Yoshie H. The trans-chromosomal mouse-derived

human monoclonal antibody promotes phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis* by neutrophils. *J Periodontol*. 2005 76(5):680-5.

4: Motoki K, Mori E, Matsumoto A, Thomas M, Tomura T, Humphreys R, Albert V, Muto M, Yoshida H, Aoki M, Tamada T, Kuroki R, Yoshida H, Ishida I, Ware CF, Kataoka S. Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin Cancer Res*. 2005 11(8):3126-35.

5: Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello DE, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005 23(17-18):2269-72.

6: Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, Tomizuka K, Ishida I, Robl JM. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle. *Nat Genet*. 2004 36(7):775-80.

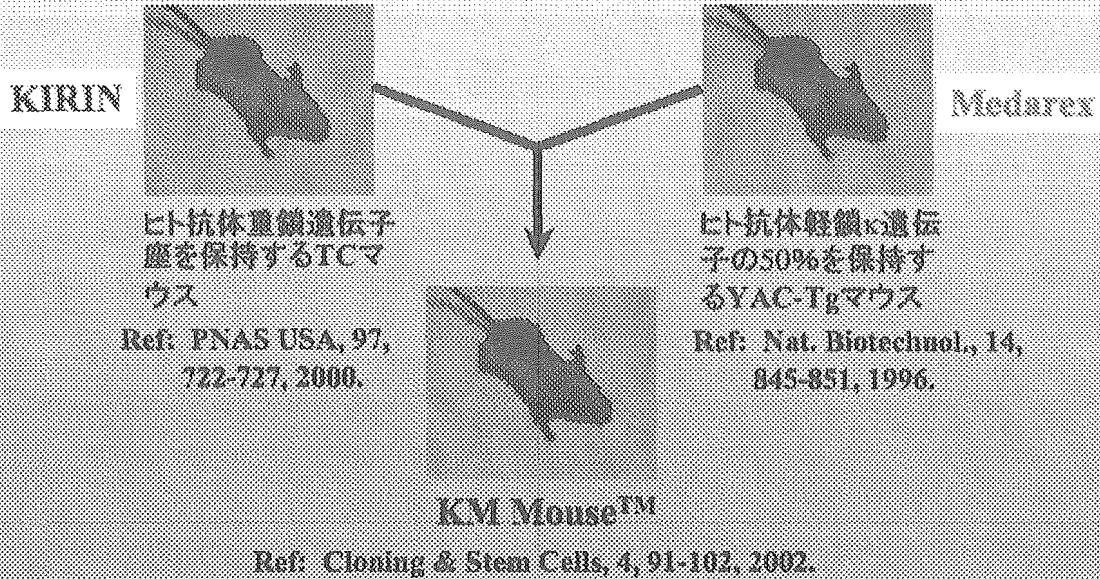
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

図 1

KMマウス™

KIRIN

キリン医薬カンパニーは、2000年1月にMedarex社と提携し、ヒト抗体ビジネスのプラットフォーム技術
を確立した。両社の持つIPをクロスライセンス。

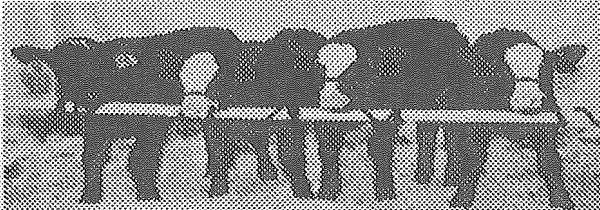


- (1) All human IgGs, IgA and IgE.
- (2) High affinity antibodies.
- (3) Success with complex immunogens.

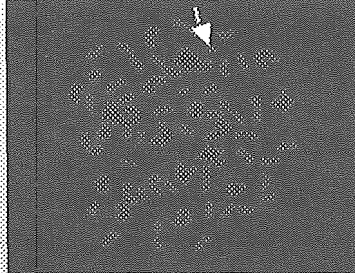
TC-cows

KIRIN

キリン医薬カンパニーは、クローン技術を持つHematech社と共同して、ヒト抗体産生ウシの開発を進めている。2005年7月、キリン社はHematechを買収し、100%子会社化した。



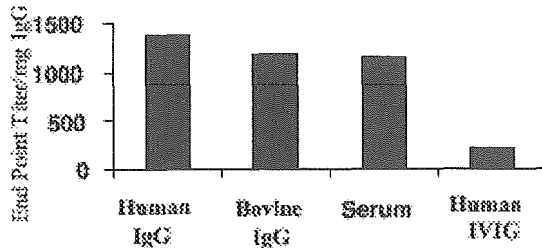
ヒト染色体を保持するクローンウシは、ヒト抗体を産出した。(1ヶ月齢)



クローンウシ由来の細胞中に、ヒト染色体(赤色)が保持されている。

Ref: Nature Biotechnol., 20, 889-894, 2002 ;
Theriogenology, 59, 107-113, 2003.

TC-cowにトキソイドを免疫



from the TC cow

抗原特異的ヒト抗体力価上昇を確認。

ヒトIgG精製法:
血漿(4回/月/頭)→CA分画→ヒトIg吸着カラム
→ウシIg吸着カラム
(500kgのウシで1年間で約400LのPlasma採取)

図 3

KO-cows

KIRIN

効率的にヒト抗体を産生させるために、ウシ内在性の抗体遺伝子を1つの細胞において連続的にKOする技術を完成。プロダクトの安全性の観点から、ウシブリオリオン遺伝子もKOする技術も完成。

Ref: Nature Genetics, 36, 775-780, 2004.

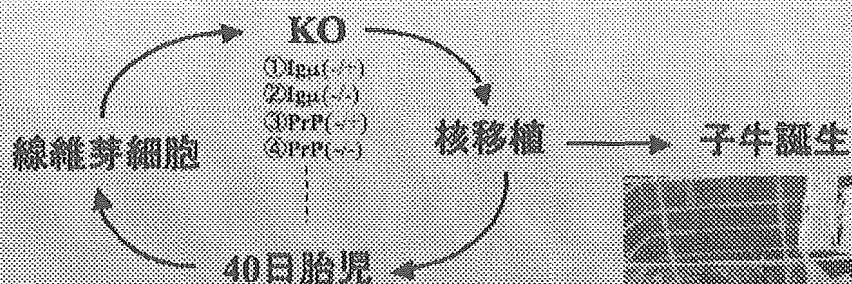


図 4

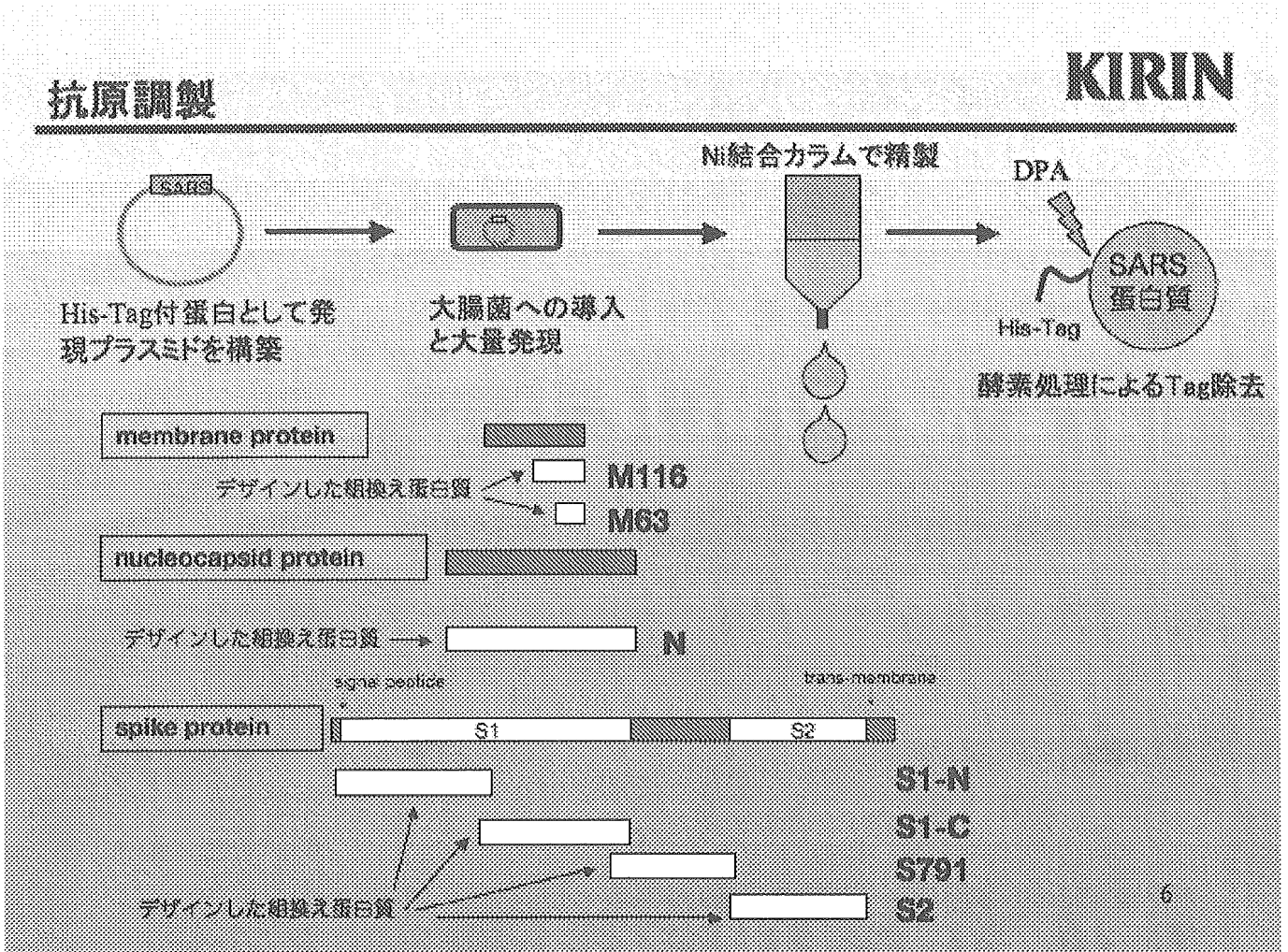


図 5

抗原免疫・力価測定

KIRIN

- ・RIBIアジュバンドで抗原をエマルジョン化。
- ・初回 ip & sc。 10日後から1週間毎に4回ip。(50 μ g/Head)
- ・可溶性蛋白をELISAプレートに付けて、HRP-抗ヒトIgGで検出。

(血清1000倍希釈)

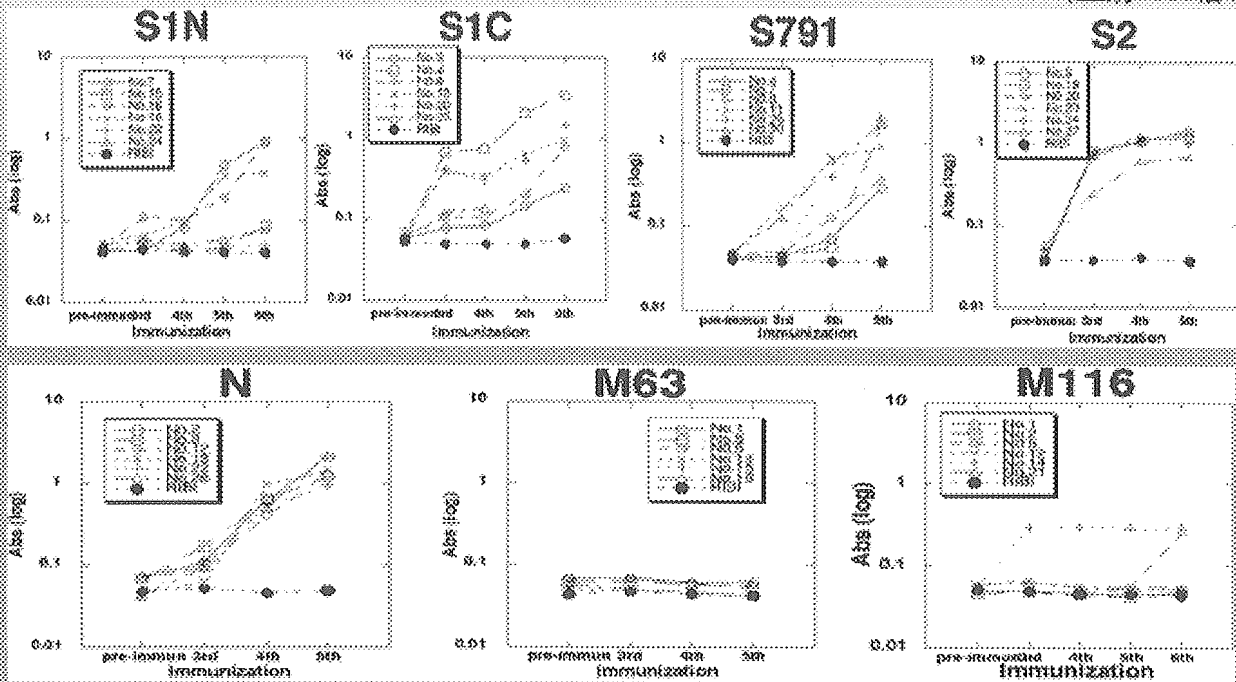


図 6

KIRIN

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ため、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 hydrogellに100%吸着→ISA-25エマルジョン化
可溶化抗原(PBS or Urea)→Aluminum hydrogell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) ₃ ISA-25	TiterM ax Gold	TiterM ax Gold	Al(OH) ₃ ISA-25	TiterM ax Gold	TiterM ax 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。

図 7

KIRIN

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 ₅₀	800	30	1600	800	<20	<20
KM ELISA	1000	1000	1000	ND	1000	ND
KM NT ₅₀	<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

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Short Communication

Trial Surveillance of Cases with Acute Respiratory Symptoms at IMCJ Hospital

Akihiko Kawana*, Katsuji Teruya, Toshihiro Hama, Emi Kuroda, Jun-ichiro Sekiguchi, Teruo Kirikae, Goh Naka, Satoshi Kimura, Tadatoshi Kuratsuji, Hiroshi Ohara and Koichiro Kudo

International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655, Japan

(Received February 1, 2005. Accepted May 18, 2005)

SUMMARY: We have developed a surveillance system that can detect a severe acute respiratory syndrome (SARS) outbreak in a hospital as quickly as possible using the "SARS alert" strategy proposed by the World Health Organization (WHO). Our research examined hospital staff and in-patients during the winter of 2003/2004. We defined patients with a fever of over 38°C and respiratory symptoms as "cases with acute respiratory symptoms." During the study period, 215 such cases (78% in-patients; 22% hospital staff members) were reported. A rapid diagnostic test for influenza was performed on 131 individuals, with 52 having positive results. There were no cases fulfilling the definition of SARS provided by the WHO in their SARS alert. The present surveillance system will be of use in the early detection of a SARS epidemic in a hospital as well as in early detection of similar illnesses accompanied by acute respiratory symptoms, such as influenza.

Severe acute respiratory syndrome (SARS) haunted the world from November 2002 to July 2003. According to the World Health Organization (WHO), over 8,000 infected patients and nearly 800 deaths were reported in 26 regions during this period. An extremely large problem in the case of SARS is the number of health care workers (HCWs) infected; at 1,706 persons, the figure accounted for 21% of all reported cases (1; http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/). Because of this problem, the WHO has proposed a new surveillance strategy known as the "SARS alert" (2; <http://www.who.int/csr/sars/postoutbreak/en/>). If a SARS alert occurs, the WHO recommends that strict infection control procedures be adopted immediately. However, the introduction of this policy requires daily surveillance in accordance with the definition of a SARS alert. Additionally, this surveillance targets not only in-patients but also hospital personnel. To date, the WHO has not yet indicated any specific methods for the application of SARS alert surveillance to hospital personnel.

Therefore, we attempted to create a new surveillance system to detect clinical SARS cases as defined by the SARS alert in both patients and HCWs. To facilitate the detection of SARS as well as other respiratory infectious diseases such as influenza, the present surveillance focused on cases with "acute respiratory symptoms".

These definitions used for this surveillance were a fever of over 38°C and one or more symptoms of respiratory tract illness (RTI), including both upper RTI (rhinorrhea or sore throat) and lower RTI (coughing, sputum, shortness of breath, decreased SpO₂, or radiographic evidence of lung infiltrates consistent with pneumonia or respiratory distress syndrome [RDS]).

The subjects were all in-patients, nurses, doctors, technicians, pharmacists or other medical staff at the International Medical Center of Japan (IMCJ) hospital, Tokyo, Japan. The

study period was from December 2003 to March 2004. If a patient or HCW with acute respiratory symptoms was identified, the head of each section filled in a surveillance report and submitted it to an infection control team (ICT). The results of the surveillance were analyzed and released weekly to hospital staff by hospital intranet.

During the study period, 215 cases with acute respiratory symptoms were reported. Their median age was 39.0 years of age (range: 5 mos-99 years of age), and the male:female ratio was 1:1.05. Wards in which numerous cases were reported were the pediatric ward (36 cases), the respiratory ward (20 cases) and the private room ward (18 cases). The identified cases included 168 in-patients (78%), 26 nurses (12%), 15 doctors (7%), 4 technicians (2%) and 2 pharmacists (1%). A rapid test for influenza (Espline[®]; Fujirebio, Inc., Tokyo, Japan) (3) was performed in 131 cases (61%), and 40% of tested individuals were found to be positive. Trends in the reported cases are shown in Figure 1. There was a peak in the number of reported cases from the 3rd week of January to the 2nd week of February, coinciding with a peak in influenza cases at the IMCJ hospital. Additionally, these peaks coincided with a peak in the nation wide spread of influenza in Japan (4; <http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/weeklygraph/01flu-e.html>).

During the surveillance period, one cluster of cases with acute respiratory symptoms was found in our hospital. The episode was observed in the respiratory ward and included 11 cases with acute respiratory symptoms; 4 of which tested positive on the rapid diagnostic test for influenza. This finding caused the ICT to quickly introduce appropriate infection control measures such as cohort isolation, prophylactic use of oseltamivir, and limitations on the admission of new patients. With this intervention, the cluster was quickly controlled.

During the study period, no actual SARS alert cases that met the WHO definition were observed.

SARS is characterized by its high transmissibility to HCWs and becomes widespread via nosocomial infection (5,6). Therefore, both in-patients and HCWs with symptoms must be constantly monitored in order to detect a SARS outbreak

*Corresponding author; Mailing address: International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan. Tel: +81-3-3202-7181, Fax: +81-3-3207-1038, E-mail: akawana@imcj.hosp.go.jp

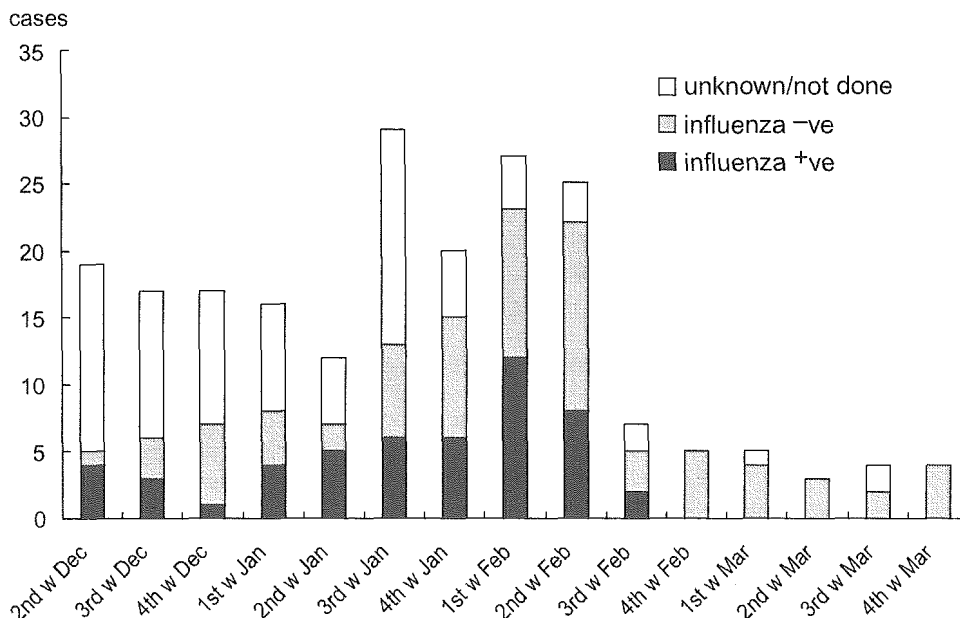


Fig. 1. Trend graph of reported case with acute respiratory symptoms between the 2nd week of December 2003 and the 4th week of March 2004.

in a hospital in the early stages. The SARS alert strategy proposed by the WHO is an operational definition used to ensure that appropriate infection control and public health measures are implemented until SARS has been ruled out as a cause of pneumonia or RDS.

This policy defines SARS cases clinically as cases with a fever of over 38°C, with one or more symptoms of lower RTI (coughing, difficulty breathing, or shortness of breath), with radiographic evidence of lung infiltrates consistent with pneumonia or RDS, and with no alternative diagnosis that can fully explain the illness. SARS alert situation is defined as one or both of the following:

- i) two or more HCWs in the same health care unit fulfilling the clinical case definition of SARS and whose onset of illness occurs within the same 10-day period; and
- ii) hospital-acquired illness in three or more persons (HCWs and/or other hospital staff and/or patients and/or visitors) in the same health care unit fulfilling the clinical case definition of SARS and whose onset of illness occurs within the same 10-day period.

Because the threat of infection involves not only SARS but also other emerging respiratory virus infections (i.e., new types of influenza), we attempted to create a system that can also detect acute respiratory infections such as influenza in a hospital. Because the early clinical features of SARS and influenza are quite similar, some confusion in clinical settings is expected. Hence, a “syndromic surveillance” system, that is, a system that detects acute respiratory symptoms without regard to the pathogenic virus, must be developed. Therefore, we partially modified the WHO’s SARS alert strategy and introduced a new method of surveillance for the early detection of SARS and influenza.

Our criteria for the definition of disease differed from that of the WHO in that it included upper RTI and (ii) it did not require pneumonia findings in chest X-rays. We felt that adding these changes would allow the detection of influenza outbreaks in a hospital as well.

An epidemic of cases with acute respiratory symptoms during the aforementioned period was effectively monitored

during surveillance at IMCJ hospital. An outbreak of influenza at the hospital was also detected by the present surveillance system. Information provided by surveillance was effectively used for infection control. Fortunately, there were no cases that met the definition of SARS provided by the WHO in their SARS alert. Hospital staff should be informed as soon as possible about the spread of infectious diseases in the hospital. We used hospital intranet for this purpose, and information was quickly conveyed to the appropriate divisions of the hospital.

The present surveillance strategy will be of use in the early detection of a SARS epidemic in a hospital as well as in the early detection of similar illnesses accompanied by acute respiratory symptoms such as human influenza and new types of influenza. Further study is needed to improve the sensitivity and specificity of this surveillance.

REFERENCES

1. World Health Organization (2002): Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003.
2. World Health Organization (2003): Alert, verification and public health management of SARS in the post-outbreak period.
3. Mitamura, K., Yamazaki, M., Ichikawa, M., Kimura, K., Kawakami, C., Shimizu, H., Watanabe, S., Imai, M., Shinjo, M., Takeuchi, Y. and Sugaya, N. (2004): Evaluation of an immunochromatography test using enzyme immunoassay for rapid detection of influenza A and B viruses. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 78, 597-603 (in Japanese).
4. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases (2005): Trend graph. Influenza cases reported per sentinel weekly. *Infect. Dis. Wkly. Rep.*
5. Booth, C. M., Matukas, L. M., Tomlinson, G. A., Rachlis, A. R., Rose, D. B., Dwosh, H. A., Walmsley, S. L., Mazzulli, T., Avendano, M., Derkach, P., Ephtimios, I. E., Kitai, I., Mederski, B. D., Shadowitz, S. B., Gold, W.