

厚生労働科学研究費補助金

平成18年度

新興・再興感染症研究事業

SARSコロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究  
(H16—新興—一般—039)

研 究 報 告 書

平成19年3月

主任研究者 森川 茂  
(国立感染症研究所)

# 目 次

I. 総括研究報告書	
SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究 .....	1
主任研究者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第1部）	
II. 分担研究報告書	
1. 組換え SARS-CoV 抗原を用いた PA ビーズ法による抗体検出法の開発 .....	13
分担研究者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）	
2. VSV-pseudotype による SARS-CoV 迅速中和抗体測定 .....	17
分担研究者：福土秀悦（国立感染症研究所・ウイルス第1部）	
3. シュードタイプおよび組換えウイルスを用い中和抗体測定系の開発 .....	23
分担研究者：松浦善治（大阪大学・微生物病研究所）	
4. SARS コロナウイルスの迅速抗原検出キットの開発 .....	29
分担研究者：奥野良信（大阪府立公衆衛生研究所・感染症部）	
5. SARS/RT-LAMP 検出試薬開発と臨床評価 .....	37
分担研究者：田代真人（国立感染症研究所・ウイルス第3部）	
6. LAMP 法による SARS 診断法の改良 .....	45
分担研究者：納富継宣（栄研化学株式会社・生物化学研究所）	
7. SARS 鑑別診断法の開発 .....	51
分担研究者：北村義浩（東京大学・医科学研究所）	
8. SARS-CoV 等の新興ウイルスを網羅的・迅速に検出する Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法の確立 .....	55
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第1部）	
9. SARS-CoV 感染動物モデルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析 —小動物を用いた感染モデルの開発— .....	65
分担研究者：永田典代（国立感染症研究所、感染病理部）	
10. SARS-CoV 感染動物モデルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析 .....	71
分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）	
11. ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウス組織への SARS-CoV 感染 .....	77
分担研究者：榎林 清（国立感染症研究所・獣医科学部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	83

## I. 総括研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長 森川 茂

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は、2003年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。日本では SARS 発生直後から水際での懸命な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国で感染者が発生することを想定して迅速診断体制を整備することが必要である。SARS コロナウイルス(SARS-CoV)は BSL3 での取扱いが必要であるが、海外（シンガポールと中国）の研究室で、実験室感染が報告され、中国では実験室感染者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでた。このため、実験室診断、特に血清診断に用いる抗原調製に大量の SARS-CoV の培養を行う必要のない組換え抗原を用いた診断系を開発した。特に血清診断で最も信頼性の高いウイルス中和試験においても SARS-CoV の培養を必要としない系を開発した。RT-LAMP の評価及び改良についても検討した。また、簡便に臨床現場でのウイルス抗原の検出が可能なイムノクロマト法を開発した。類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断用 RT-LAMP を開発し、特にインフルエンザとの迅速鑑別が可能であることを明らかにした。さらに、SARS のような新興ウイルス感染症発生時に、病原ウイルスの特定と遺伝子情報を迅速に得られるようなシステムの開発も行なった。また、ウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である SARS-CoV の感染モデル動物の開発を行なった。本研究では、これらに関して以下の研究成果を得られた。

- 1) SARS-CoV 培養抗原の作製は BSL3 レベルで行い、ウイルスの不活化を確認する必要がある。そこで、安全に抗原を調製するために、SARS-CoV の組換え N 蛋白を発現、精製して抗体検出 ELISA を確立した。特に他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで、特異性を高めることに成功した。この抗原を用いた IgG-ELISA、IgM 捕獲 ELISA を開発し、抗体検出までの window period を短縮できた。より簡便な凝集(PA)法も開発した。
- 2) 最も信頼度の高い抗体検査法であるウイルス中和抗体測定法を安全かつ迅速に行うために、SARS-CoV の S 蛋白を被った VSV-pseudotype を用いた中和試験を開発した。よりハイスループットな系として分泌型酵素を発現する系も開発した。これらにより中和抗体測定が 10 時間で可能になった。また、ウイルスレセプターである ACE2-VSV-pseudotype 及び ACE2 組換え VSV を作製し、中和試験への応用が可能であることを明らかにした。
- 3) SARS-CoV の N 蛋白の単クローン抗体を用いた迅速なイムノクロマトを開発した。
- 4) SARS-CoV ゲノム検出に関しては、LAMP 法の感度向上を目的として、ヘパリン・ラクトフェリンの阻害の影響の小さな逆転写酵素の使用及び RT-LAMP 反応系に RNase inhibitor の添加に関して検討した結果、感度向上効果が期待できた。RNA 抽出キットに

関しては、Qiagen RNA 抽出キットが比較的安定した成績を示し、さらに抽出 RNA を濃縮することで 5-10 倍高感度になった。より、迅速化するために RNA 抽出キットを用いずに行なえる簡易前処理法を開発した。

5) 迅速鑑別診断用 LAMP 法に関しては、インフルエンザウイルス A、B、ヒトコロナウイルス 229E、マイコプラズマ検出用 LAMP 法を開発した。特にインフルエンザでは、患者検体を用いて評価した結果、市販イムノクロマトキットと比較して検出感度がかなり高かった。

6) 新興ウイルス感染症発生時に、ウイルスの遺伝子情報が不明でもその遺伝子を増幅する方法として改良 RDA 法及び RDV 法を開発した。RDV 法により、SARS-CoV 遺伝子や種々のウイルス遺伝子配列情報の取得を遺伝子組み換えを行わずに可能にした。

7) SARS-CoV 感染小動物モデル系の開発に成功した。マウス、ラットでそれぞれ in vivo 継代した SARS-CoV を感染させると、それぞれの加齢動物で肺水腫を伴う SARS 様症状を呈した。マウスでは 30-50%の致死率であった。

8) SARS-CoV のレセプター(ACE2)トランスジェニックマウスを作製し SARS-CoV を感染した結果、肺および脳での高いウイルス増殖を伴い致死的な感染が観察された。

分担研究者：

奥野良信 (大阪府立公衆衛生研究所部長)  
北村義浩 (東京大学医科学研究所感染症分野助教授)  
田代真人 (国立感染症研究所ウイルス第3部部長)  
棚林清 (国立感染症研究所獣医科学部室長)  
納富継宣 (栄研化学株式会社生物化学研究所第2部部長)  
長谷川秀樹 (国立感染症研究所感染病理部室長)  
森田公一 (長崎大学熱帯医学研究所病原体解析部門分子構造解析分野教授)  
松浦善治 (大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター教授)  
福士秀悦 (国立感染症研究所ウイルス第1部)  
永田典代 (国立感染症研究所感染病理部)

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は、2003 年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。日本では、水際の懸念な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国においても感染者が発生することを想定して対応することが必要である。SARS の初期症状は、インフルエンザ等のそれと類似し臨床的な鑑別は不可能であることから、より高感度で迅速な実験室診断が求められる。また、SARS-CoV を扱っている海外(シンガポールと中国)で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでたことから、ウイルス培養を必要としない安全な実験室診断体制の確立は急務である。SARS が臨床上疑われた場合、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ができる。SARS コロナウイルス(SARS-CoV)特異抗体は、ウイルス抗原を用いた抗体検出系では、発症後 9 日程度から検出できるが、組換え抗原

を用いた高感度検出系によりその window 期間をできるだけ短縮する必要がある。また、他のヒトコロナウイルスとの抗原性の交叉にも留意する必要がある。一方、抗体応答前にはウイルス直接検出法として LAMP 法等によるウイルス遺伝子検出が有効であるが、改良が可能であるか検討する必要がある。また、類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断も院内感染対策、公衆衛生学の観点から必要である。さらに、SARS の様な新興ウイルス感染症が今後発生した場合に、ウイルス遺伝子情報が未知の時点でも遺伝子増幅が可能であれば、病原ウイルスの同定や検査系の開発がはるかに短縮できる。また、SARS-CoV の感染モデル動物の開発は、病原性の解明、ワクチンや抗ウイルス薬の有効性試験に活用できるだけでなく、感染後のウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である。

本研究では、抗体検出感度を上げて抗体検出までの window 期間を短縮すること、抗体検出法の迅速化、安全なウイルス中和抗体測定法の開発、ウイルス遺伝子・蛋白の検出法の改良と至適サンプルの検討を行い、SARS の実験室診断の精度向上と迅速化を行うことを目的とした。本年度は、3 年計画の 3 年目にあたるが、ウイルス培養の必要のない組換え抗原によるより迅速な IgG、IgM 抗体検出法の開発、SARS-CoV を用いない安全なウイルス中和抗体測定法の改良、抗原検出のためのイムノクロマト法の開発、LAMP 法による SARS-CoV 検出の至適化と迅速化、迅速鑑別診断用 LAMP 法の臨床材料を用いた評価、RNA ウイルスの遺伝子を特異的な primer を用いずに、効率よく増幅して遺伝子配列を決定する Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法の開発、齧歯類での継代による SARS-CoV の馴化と SARS 発症モデル系の

確立、ACE2-トランスジェニックマウスによる SARS-CoV 感染モデル系の確立を行った。これまでの成果と今年度の成果を併せて、より迅速で安全な実験室診断法を統括的に開発することができた。

## B. 研究方法

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた IgG、IgM 抗体検出 PA ビーズ法の開発：

SARS-CoV の N 蛋白の 5'末端側に His-tag を付加し、N 末端 121 残基を除いた SARS-CoV NΔ121 組み換え蛋白を表層に固定化した Ha-Ny ビーズを調整した。抗 IgG、抗 IgM 抗体を固相化した V 字型 96 穴プラスチックプレートに検体を添加して IgG、IgM を捕獲し、ビーズを添加して反応を目視で判定できる系を開発し、同様の抗原を用いた ELISA 法と感度を比較した。

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

昨年度までに開発評価した、S 蛋白の C 末端側の細胞質ドメイン 19 アミノ酸を欠損させた S 蛋白を被った VSV シュードタイプウイルスを用いたウイルス中和試験法をよりハイスループットな系にするために、改良を試みた。昨年までに作製した系は、シュードタイプウイルスの感染のマーカーとして感染細胞での GFP 発現による蛍光を指標に感染価を測定する系であるが、本年度は、分泌型アルカリフォスファターゼを発現する系を開発し、培養上清の酵素活性を想定することにより、より迅速に多量検体のウイルス中和抗体の測定を可能にすることを試みた。

また、VSV の G 遺伝子を SARS-CoV のレセプターである ACE2 遺伝子に組換えた組換えウイルスを作製した。この組換えウイルスを用いて、SARS-CoV S 蛋白発現細胞でのみ増殖可能なウイルスを作製し、ウイ

ルス中和抗体測定法への応用を試みた。

(3) SARS 迅速抗原検出キット開発：

イムノクロマト法による迅速診断法を開発するための単クローン抗体を検討した。イムノクロマト法での反応検出法としては、金コロイド法とラテックス凝集法を比較検討した。開発したイムノクロマト法の感度を感染力価の既知の SARS-CoV を用いて検討した。

(4) RT-LAMP 法の改良のための基礎研究：

栄研化学株式会社で現行開発済みの試薬のプライマーより高感度に SARS-CoV ゲノムを検出できるプライマーは見出せなかった。そこで、より迅速化するための検討を行った。特に、RNA 抽出キットを用いた RNA 抽出過程を行わずに検体を前処理液で処理後に直接 RT-LAMP 反応が行なえる処理法を検討した。検体として咽頭スワブを用いることが想定されるが、SARS 患者の咽頭スワブ検体が入手不可能であるため、インフルエンザウイルス検出用 RT-LAMP を用いて前処理法を評価した。

(5) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の評価：

SARS-CoV と初期症状の類似する A 型・B 型インフルエンザウイルス、ヒトコロナウイルス 229E、マイコプラズマを対象とした LAMP 法をこれまで開発した。今年度は、A 型インフルエンザ検出用 RT-LAMP 法を臨床検体を用いて、市販のイムノクロマト法のキットと比較して評価した。

(6) Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法の開発：

ウイルス粒子外の主に細胞に由来する核酸を nuclease 処理により除去し、特異的 primer を用いない全遺伝子増幅技術を用い

て遺伝子を均等に増幅し、さらにアダプターを付加した後に特殊な primer sets による PCR を行い、均一な amplicon を増幅してダイレクトシーケンスを行なう系の開発を行った。

(7) SARS-CoV の齧歯類への馴化と SARS 発症モデル系の開発：

SARS-CoV をラットあるいはマウスに経鼻接種し、感染 3 日目の肺洗浄液を同様に感染するウイルス継代を行い、ウイルス遺伝子の変異、ウイルスの病原性の増強効果を昨年までに検討した。本年度は、この感染系を用いて加齢動物での SARS 発症モデルの開発を試みた。

(8) ACE2 トランスジェニックマウスを用いた SARS 感染モデル系の開発：

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスをこれまでに作製し、その肺および腎臓の初代培養細胞での SARS-CoV の増殖が、対象マウスの細胞と比べて極めて良いことを明らかにしてきた。今年度は、3 ラインのトランスジェニックマウスを増殖し、SARS-CoV の感染実験を行い、SARS 感染もできる系としての有用性を評価した。

(倫理面への配慮：ヒト検体の使用に当たっては、各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た。動物実験は、各研究機関の動物実験委員会の承認を得た。遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等の使用（第二種使用）の承認を得た。)

C. 結果

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた IgG, IgM 抗体検出 PA ビーズ法の開発：

組換え SARS-CoV N<sub>4121</sub> 蛋白を Ha-Ny 複合体ビーズの表層にを固定化した。対象としては、組換え SARS-CoV N 蛋白を同様に

固相化した。マイクロプレートに抗ウサギ IgG 抗体を固定化して SARS-CoV N 免疫ウサギ血清とコントロールの陰性血清を添加して、IgG を補足させ洗浄したのち、抗原を表層に固定化した Ha-Ny ビーズを添加して 20 分間反応させ沈降凝集パターンを観察した。抗体陽性血清では SARS-CoV N 抗原に対し 10,000 倍希釈まで陽性パターンを示した。一方、SARS-CoV NΔ121 抗原に対しては 1,000~3,000 倍まで陽性パターンを示した。IgG-ELISA 法と比較して感度は同等以上であった。一方陰性血清についてはいずれの抗原においても最小希釈である 100 倍希釈でも非特異凝集反応を示さなかった。マイクロプレートに抗 IgM 抗体を固定化することにより、同様に IgM 抗体を測定できる。

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

昨年度までに開発評価した VSV-pseudotype を用いた中和試験法は、感度 97%、特異性 86%であった。しかし、この系は VSV-pseudotype の感染の指標に GFP 発現を蛍光顕微鏡下で観察する系であるため、少数の検体の中和試験には適しているが、他検体の処理には時間を要する。そこで、マーカー遺伝子に分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子を持つ VSV-pseudotype を作製し (VSV/SEAP-SARS-St19)、Vero E6 細胞に感染後、培養上清中に分泌される酵素活性を化学発光法によりマイクロプレートルミノメーターを用いて測定する方法を開発した。本方法により 96 ウェルプレートでのシュードタイプの感染性を同時に解析することが可能となった。ウサギ抗血清を用いて中和試験を行った結果、抗体陰性血清では VSV/SEAP-SARS-St19 の感染を阻害しなかったが、抗 SARS-CoV 血清、および抗 SARS-CoV S 蛋白血清では

VSV/SEAP-SARS-St19 の感染を阻害した。また、健常人血清では費特異的感染阻害が見られなかった。本中和試験法は、多検体の中和試験法として有用であると考えられる。

一方、レセプターである ACE2 を同様に pseudotype した VSV を作製したところ、SARS-CoV S 蛋白発現細胞特異的に感染した。そこで、VSV G 遺伝子を ACE2 遺伝子に置き換えた組換え VSV を作製した結果、同様に S 蛋白発現細胞に感染した。この組換え VSV は、VSV-pseudotype と異なり S 蛋白発現細胞では、自立増殖できる。組換え VSV 感染は、抗 ACE2 抗体、抗 SARS-CoV 抗体で阻害されたことから、中和試験への応用が可能であると思われる。

(3) SARS 迅速抗原検出キット開発：

SARS-CoV の S 蛋白及び N 蛋白に対する単クローン抗体を用いてイムノクロマト法での検出感度の高い組み合わせを検討した結果、N 蛋白に対する 2 種類の単クローン抗体 (SKTO8 と SKTO9) を用いたラテックス粒子法によるイムノクロマト法が最も感度が高かった。ヒトのコロナウイルスを含む種々のウイルス、細菌との交差反応は全く認められなかった。SARS-CoV は、感染価  $10^6$  PFU/mL 以上では明瞭に検出できた。本試験法は、10 分程度で結果が得られる。

(4) RT-LAMP 法の改良のための基礎研究：

SARS-CoV 用の RT-LAMP 法のキットでは、検体から RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出して反応系に加える。そこで、より迅速化するために、検体を前処理して直接反応系に加える系を開発した。SARS 患者の咽頭スワブ検体が入手困難であるため、評価系にはインフルエンザ A 型用の RT-LAMP 系を用いた。その結果、咽頭スワ



ブの生理食塩水懸濁液を非イオン性界面活性剤、RNase inhibitor を含む処理液と等量混合し、80°C、5分間処理後、RT-LAMP系に加えたところ、25 $\mu$ LのLAMP反応液中に最大4.5 $\mu$ Lまで持ち込むことが可能であった。この前処理法により、SARS-CoVのRT-LAMPはより簡便で迅速化できることが明らかになった。

(5) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の評価：

これまでに、鑑別診断用 LAMP 法を種々の病原体に対して開発した。今年度は、臨床検体を用いてインフルエンザ A 型検出 RT-LAMP 法を評価した。冬季に発生した上気道炎症状を有する発熱成人患者の鼻咽頭ぬぐい液検体 (310 検体) について市販のイムノクロマトキットで検査した結果、100 検体からインフルエンザ A 型抗原が検出された。一方、RT-LAMP 法では 188 検体からインフルエンザ A 型遺伝子が検出され、市販のイムノクロマトキットより高感度であることが明らかとなった。

(6) Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法の開発：

SARS-CoV やマウスウイルス培養上清から細胞由来 DNA、RNA を除去した後にウイルス RNA を抽出し cDNA を作製し、全遺伝子増幅キットを用いてウイルス遺伝子 cDNA の 1 次ライブラリーを作製した。Hae III 切断とリンカーライゲーション後に、特別にデザインした primers の組み合わせ 96 種類で 2 次 PCR を行なった結果、いくつかの primers 組み合わせでシングルバンドとして PCR amplicon が得られた。これらをダイレクトシーケンシングすると amplicon の半数以上がウイルス遺伝子を含んでいた。この RDV 法は 2 日以内に遺伝子情報が得られる。また、ウイルスの遺伝子情報が不要であるため新興・再興ウイルス感染症発生時

にウイルス遺伝子情報を得て原因ウイルスを迅速に同定する上で有用であると考えられる。

(7) SARS-CoV の齧歯類への馴化と SARS 発症モデル系の開発：

ラットで継代し馴化した SARS-CoV を用いて 4 週齢と 8 ヶ月齢の動物に感染実験を行ったところ、8 ヶ月齢のラットで強い肺水腫を伴う SARS 様病変が観察された。このモデルにおけるウイルスの感染局在と抗体価について調べた結果、鼻腔粘膜上皮、気管と肺胞の上皮でのみウイルス抗原陽性細胞が検出され、リンパ節からウイルスが分離された。血清中からウイルスは分離されず、感染後 5 日以降から中和抗体価の上昇が観察された。ラット馴化 SARS-CoV 感染モデルを作製した。

一方、マウス馴化 SARS-CoV の感染実験を行ったところ、ラットと同様に齢による病態の相違がみられた。また、半年齢マウスでは強い肺水腫とびまん性肺胞傷害を呈す SARS 類似の病態を示し、かつ、30-50% の致死率であった。高齢者における SARS 発症機序やウイルス動態、免疫応答を解明するための有用な動物モデルを確立した。

(8) ACE2 トランスジェニックマウスを用いた SARS 感染モデル系の開発：

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスをこれまでに作製し、その肺および腎臓の初代培養細胞での SARS-CoV の増殖が、対象マウスの細胞と比べて極めて良いことを明らかにしてきた。確立した 3 ラインのトランスジェニックマウスへ SARS-CoV の経鼻的感染を行った結果、いずれのラインでも 3 日目に神経症状を呈し、肺および脳で高力価のウイルス増殖を伴い 4 から 5 日目に斃死し、SARS-CoV に高感受性であることが明らかになった。

#### D. 考察

SARS は、2003 年に中国で発生後、短期間の間に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。日本では幸い患者発生はなかったが、SARS-CoV の自然宿主が日本にも分布するキクガシラコウモリであると報告されたことから、今後、輸入感染症としてだけでなく、国内の宿主動物を原因とする SARS 患者が発生する可能性を想定して対応することが必要である。SARS-CoV を扱っている海外の研究室で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例もでた。

本研究では、安全にかつ迅速に行なえる SARS の実験室診断法を確立し、併せて精度向上を目指して、1) 不活化ウイルス抗原、組換えウイルス蛋白を用いた抗体検出法に関する研究、2) SARS-CoV を用いないウイルス中和抗体測定系に関する研究、3) SARS-CoV 遺伝子の検出法の改良と抗原迅速検出系の開発に関する研究、4) 類似の症状を呈する呼吸器感染症との迅速鑑別診断法の開発に関する研究、5) SARS 等の新興ウイルス感染症発生時に迅速にウイルスを検出同定する方法の開発に関する研究、6) SARS モデル動物の開発に関する研究を行ってきた。その結果、前年度までと今年度の成果と併せて以下の成果を得た。

1) 組換えウイルス蛋白、ウイルス様粒子抗原を用いた抗体検出法に関する研究：

組換えウイルス蛋白による SARS-CoV を用いない抗体検出系の開発：組換え N 蛋白の他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで、抗体測定の特異性を高めることに成功した。この抗原を用いた IgG-ELISA、IgM 捕獲 ELISA を開発した結果、

不活化ウイルス抗原を用いた系よりも抗体検出の window 期間を短縮できた。さらに、より簡便な凝集(PA)法も開発した。

2) SARS-CoV を用いないウイルス中和抗体測定系に関する研究：

1. 水疱口内炎ウイルス(VSV)のG蛋白欠損ウイルスに SARS-CoV S 蛋白を取り込ませる VSV-pseudotypen による非増殖性ウイルス感染系を確立した。この系を用いて、高感度、迅速なウイルス中和抗体測定法を確立した。さらに、VSV-pseudotypen の感染のマーカーとして分泌型アルカリフォスファターゼを発現する系も開発しハイスループットな測定系が構築できた。
2. VSV の G 遺伝子を ACE2 に入換えた組換え VSV を作製し、SARS-CoV S 蛋白発現細胞に感染する系を開発した。この系でもウイルス中和抗体測定が可能であった。

3) SARS-CoV 遺伝子の検出法の改良と抗原迅速検出系の開発に関する研究

1. LAMP 法に用いるプライマーを検討したが、現行プライマーが最高感度であった。逆転写反応の阻害活性のあるラクトフェリンとヘパリンの影響が小さいものが 1 種みつかった。また、反応溶液に RNase inhibitor を添加することにより RNase の影響抑制に有効であった。簡易前処理後の検体から RT-LAMP 反応を行い迅速化できることを明らかにした。
2. SARS-CoV の単クローン抗体を作製し、イムノクロマトグラフィー法による SARS-CoV 抗原検出系を検討した結果、N 蛋白特異的単クローン抗体を用いたサンドイッチ系が高感度であった。
- 4) 鑑別診断法の開発に関する研究  
類似症状を呈する呼吸器感染症との迅速鑑別診断法に関しては、A 型インフル

エンザウイルスとヒトコロナウイルス 229E に関しては極めて高感度の LAMP 法が確立できた。臨床検体を用いてインフルエンザウイルス検出 RT-LAMP 法を評価した結果、市販のイムノクロマトキットより高感度に検出できた。

5) SARS 等の新興ウイルス感染症発生時の、迅速ウイルス同定法の開発に関する研究：

1. Representational difference analysis(RDA) 法を改良することにより、特異的プライマーを用いずに SARS-CoV 遺伝子が検出できた。
2. Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法を開発した。RDV 法では、未知のウイルス遺伝子を増幅し直接遺伝子配列情報を得ることができるため、SARS 等の新興ウイルス感染症発生時に迅速に病原ウイルスの同定が可能になる。この方法では、遺伝子組換えを行わないため特に新興感染症発生時の初期対応上極めて有効な方法となる。

6) SARS モデル動物の開発に関する研究

1. SARS-CoV 感染小動物モデル系 (1):ラットで 10 代継代した SARS-CoV は、S 蛋白の ACE2 結合領域にアミノ酸の置換が生じ、ラットでのウイルス増殖および病変形成の増加が認められた。特に加齢動物では、肺水腫等の SARS 様症状を呈した。
2. SARS-CoV 感染小動物モデル系 (2):マウスで継代した SARS-CoV を加齢動物に感染することにより、肺水腫等の SARS 様症状を呈し、致死率 30-50%となる系を確立した。
3. SARS-CoV 感染小動物モデル系 (3):ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウ

スを作製した。このマウスでは肺と脳での高い SARS-CoV 増殖を伴う致死的な感染をおこした。

4. SARS-CoV 感染サル系：気管内感染カニクイサルの接種後 7 日目の肺、肺門リンパ節の他、脾、腸間膜リンパ節および胃から直腸におよぶ腸管から感染性ウイルスあるいはウイルスゲノムが検出され、開発した診断システムを統括的に評価する際のサンプルとして有効利用できた。

これらの研究成果により、SARS の検査法の精度向上及び迅速化ができた。また、SARS-CoV を使用しないためより安全に検査を行う体制が確立された。今後 SARS 患者が発生した場合に、より迅速かつ的確に検査を行うことができる。

#### E. 結論

SARS-CoV の培養系を使用しない血清診断系の開発により、実験室感染のリスクを回避できる。また、迅速に抗体測定が可能であり、抗体検出の window 期間を短縮できた。迅速にウイルス抗原を検出するイムノクロマト法が開発された。RT-LAMP 法をより簡便に迅速化することができた。また、類似初期症状を呈する感染症との鑑別診断用 LAMP 法も開発され、インフルエンザ用 RT-LAMP 法の有用性を臨床検体を用いて評価した。感染動物モデル系で得られる材料を用いて、今後、より良い検査法が開発された場合に、その精度・感度検定が可能となった。また、齧歯類に馴化した SARS-CoV によるラット、マウスでの SARS 発症モデル系が確立された。ヒト ACE2 トランスジェニックマウスは、SARS-CoV に高感受性であることが明らかになった。

#### F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Shigeru Morikawa, and Kouichi Morita: Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein as Antigen in a Novel Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol.14, 146-149, 2007
2. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2007) Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by Mycoplasma fermentans. *Arch Virol*. in press
3. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, and Nishimura H. (2007) Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(2): 322-4.
4. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. (2007) Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine*. in press
5. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. (2006) Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J Virol.*, 81(4):1848-57
6. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, Morikawa S. Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *J Med Virol*. 2006, 78 (12) :1509-12.
7. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 581: 593-6.
8. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris JS, DeMello DE, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol*. 2006;581:561-6.
9. Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa S, Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv Exp Med*

- Biol. 2006;581:519-22.
10. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581:515-8.
  11. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:293-6.
  12. Matsuyama S, Ujike M, Ishii K, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581: 253-8.
  13. Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirota K, Kurane I, Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(1):261-5.
  14. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology.* 2006;351(2):368-80.
  15. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 46 (2) :236-43.
  16. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006; 580 (5) :1417-24.
  17. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H. Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol,* 2006 78:954-963.
  18. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes and Infection* 2006 Oct;8(12-13):2706-14.
2. 学会発表
    1. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：HCVエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSV、第54回日本ウイルス学会学術集会・総会、名古屋、2006年11月19-21日
    2. 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治：カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、第54回日本ウイルス学会学術集会・総会、名古屋、2006年11月19-21日
    3. Watanabe R, Maejima M, Fukushi S, Matsuyama S, Morikawa S, and Taguchi F.

- Cleavage of spike protein defines the entry pathway of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
4. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Harashima A, Sato Y, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, and Sata T. Animal models of severe acute respiratory syndrome using rodent-passaged SARS-CoV. Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
  5. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S. Amino acid substitutions on S2 region responsible in enhancement of SARS-CoV infection to rat ACE2-expressing cells. Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans, 2006年12月、Singapore
  6. Mizutani, T., Fukushi, S., Kenri, T., Sasaki, Y., Endo, D., Zamoto, A., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S. Molecular mechanism of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006年6月 Kyoto, Japan
  7. 渡邊理恵、前島雅美、福士秀悦、松山州徳、森川茂、田口文広. SARSコロナウイルス解裂性スパイク蛋白を持つ pseudotypeウイルスの細胞内侵入帰国に関する研究. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  8. 福士秀悦、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂. ラットACE2発現細胞で継代した SARS-CoVのS遺伝子変異. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  9. 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本綾、倉根一郎、森川茂. SARS-CoVと *Mycoplasma fermentans* の共感染が細胞に及ぼす影響. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  10. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎. マウス、ラット馴化 SARS-CoVを用いたSARS発症動物モデルの作製. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  11. 氏家誠、福士秀悦、森川茂、田口文広. SARS-CoVスパイク(S)蛋白質の Cys-rich領域は細胞間融合及びウイルス細胞侵入活性に重要な働きを持つ. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  12. 座元綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、山田靖子. フェレットACE2と SARS-CoV S蛋白質の親和性の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  13. 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田恭子. SARS-CoV Spikeに対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
  14. 池尻昌宏、西條政幸、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎. 6-クロロプリンを塩基とした核酸誘導体の SARS-CoV抑制作用. 第16回抗ウイルス

- 科学療法研究会, 福島市, 2006年5月
15. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARSコロナウイルス感染動物モデルにおける肺病変。第95回日本病理学会総会 (2006年4月新宿)
  16. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS発症動物モデルにおける肺病変。第95回日本病理学会総会 (2007年3月大阪)
  17. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻H5N1高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第10回日本ワクチン学会学術集会 平成18年10月21日-22日 大阪
  18. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈織子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)経鼻ワクチンによる感染防御 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
  19. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の感染抑制効果 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
  20. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻H5N1インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
  21. Hasegawa H, Ichinohe T, Nagata N., Iwata N, Kawaguchi A., Ami Y, Suzaki Y., Tamura S., Ninomiya A., Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M. Sata T., Kurata T., Intranasal immunization of H5N1 vaccine with TLR3 agonist, PolyI:PolyC12U protects cynomolgus monkey against HPIV challenge. Keystone Symposia 'Respiratory viruses of animals causing disease in humans' (2006.12. Singapore)
  22. Ichinohe T., Tamura S., Ninomiya A. Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M. Sata T., Kurata T., Hasegawa H. Intranasal immunization of H5N1 vaccine with TLR3 agonist, PolyI:PolyC12U protects mice against homologous and heterologous challenge. Keystone Symposia 'Respiratory viruses of animals causing disease in humans' (2006.12. Singapore)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
現在出願予定はない。

## II. 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

（分担研究課題：組換え SARS-CoV 抗原を用いた PA ビーズ法による抗体検出法の開発）

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：我々は SARS ウイルス感染流行時に利用可能な迅速で安全かつ特異的な血清診断方法の開発をめざして本研究を実施した。とくに取り扱いが危険であるウイルス粒子あるいはウイルス感染細胞を利用した血清診断ではなく、遺伝子工学的手法により合成可能な診断用抗原の開発を行い、研究初年度、SARS ウイルスヌクレオカプシド蛋白の組み換え蛋白質を用いた IgG ELISA 法が、SARS コロナウイルスの安全で特異的かつ感度の高い血清診断法であること、またこのヌクレオカプシド蛋白が大規模な疫学研究にも利用できる可能性を持つことを報告した(*Clin Diagn Lab Immunol.* **12**, 848-854)。また2年度にはこの発現蛋白質を用いて IgM 補足 ELISA 法により SARS ウイルス特異的 IgM 抗体の検出法を確立し、迅速血清診断を可能にした。本年度の研究ではベトナムにおいて発生した SARS の流行において採取された血清を用いて、特異的 IgG と IgM の出現時期について詳細に検討した。その結果、SARS ウイルス感染時には特異的 IgM の検出が極めて有用であることを確認した。これらの結果に基づき、さらに流行の現場や ELISA 法を実施できる検査、研究機関から離れた場所でも SARS 感染の特異的 IgM 検査を可能にするためのさらに簡便かつ信頼性のある方法として、上記の切断ヌクレオカプシド蛋白を抗原として用いる PA ビーズ法を試作した。今後、この方法の感度と特異性についてさらに評価を続行する予定である。

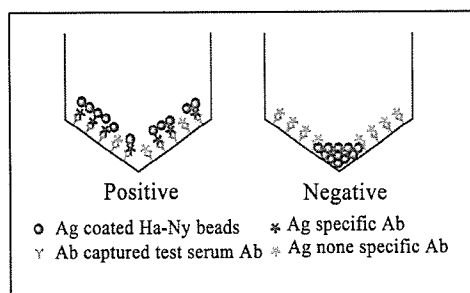
#### A. 研究目的

高度な検査機器を必要とせず、僻地やベッドサイドでも利用可能な SARS 特異的 IgM 検出による血清診断法の確立をめざして、我々が開発した遺伝子工学的手法により発現した SARS ヌクレオカプシド蛋白(SARS-CoV N)を用いた PA 法による診断キットの開発を目的とした。

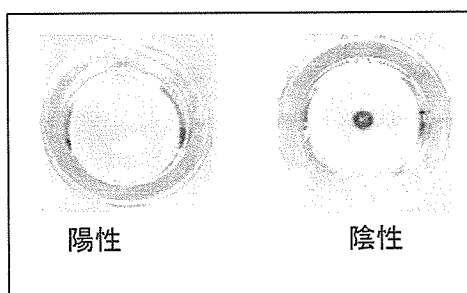
このため、ハイドロキシアパタイト-ナイロン (Ha-Ny) 複合体ビーズの表層に SARS-CoV N 組み換え蛋白を結合させ、マイクロプレートに補足された抗体との抗原抗体の適正化を実施した。本検出系の原理は、抗原を固定化した Ha-Ny ビーズと検出

目的の抗体を補足する抗体を固定化したマイクロプレートから構成されている。マイクロプレートは血清中に存在する抗体 (IgG、IgM など) を補足する。そこに抗原が固定化された Ha-Ny ビーズを添加すると、患者血清では Ha-Ny ビーズが SARS 特異的抗体と結合して V 字型ウェル側壁に補足され分散、沈着するが、陰性検体ではビーズが V 字型ウェルの底に沈降して凝集するため (図 1)、検査の陽性陰性は図 2 のように目視で判定できる特性をもつ。この方法を確立すれば、SARS の迅速血清診断がフィールドや、ベッドサイドで実施可能になり、SARS の疫学調査や臨床診断への応用

が期待される。



(図 1. PA 法の原理)



(図 2. PA 法の検出パターン)

## B. 研究方法

### 1) ELISA 抗原の調整

一昨年の報告で述べた方法で SARS コロナウイルス NΔ121 蛋白のヌクレオカプシド蛋白のアミノ酸を発現し精製した。NΔ121 蛋白は MAC-ELISA 法の抗原とともに動物の予防接種にも使用した。

### 2) PA 法による抗 SARS-CoV N 抗体の検出

1% Ha-Ny 複合体ビーズの表層に 10  $\mu\text{g/ml}$  の SARSCo-V 抗原 SARS-CoV N, または SARS-CoV NΔ121 を固定化した Ha-Ny ビーズを調整した。一方、V 字型 96 穴プラスチックプレートに抗ウサギ IgG 抗体(2  $\mu\text{g/ml}$ )を固定し、1%の牛アルブミンにてブロッキングを行った後、SARS-CoV N 蛋白で免疫したウサギ血清を段階希釈した検体を室温にて 30 分

間反応させた後、0.1%Tween20 洗浄液にて洗浄後、SARS-CoV 抗原をコートした Ha-Ny ビーズを添加して室温にて 20 分間反応させ図 2 にしめした判断基準にしたがい目視して陽性、陰性を判定した。

### 3) 間接 ELISA 法による抗 SARS-CoV N 抗体の検出

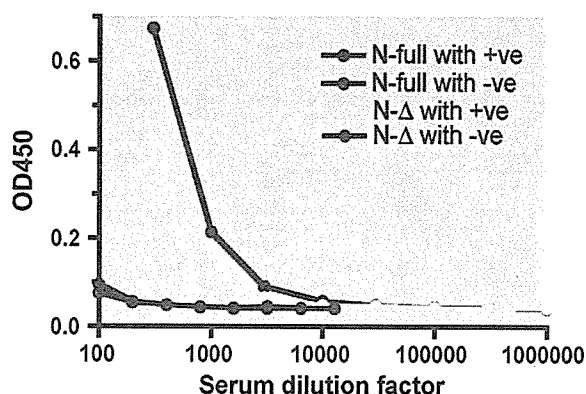
一昨年の報告で述べた方法により実施した。即ち、10  $\mu\text{g/ml}$  の SARS-CoV N, あるいは SARS-CoV NΔ121 抗原を 96 穴平底プレートに 37 度 1 時間反応させ固定したのち、1%のブロックエースあるいは牛アルブミンでブロッキングを行った後、0.1%の Tween20 洗浄液にて洗浄後 SARS ウイルス抗原または SARS-CoV N 蛋白で免疫したウサギ血清を段階希釈した検体をかくウェルに添加して 37 度で 1 時間反応後に洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を添加、再び 37 度で 1 時間反応後に洗浄して TMB にて発色させ OD450 の吸光度を測定した。

## C. 結果

### 1) 間接 ELISA 法でのウサギ SARS-CoV N 抗体の検出精度

大腸菌で発現させ精製した N 蛋白の全長と N 末端から 121 アミノ酸を取り除いた組み換え蛋白質 (SARS-CoV N, および SARS-CoV NΔ121)をプレートに 0.5  $\mu\text{g}$  固定化し、ウサギを SARS-CoV N で免疫した血清を 300 倍から 1,000,000 倍まで段階希釈した検体と、コントロールのウサギ血清を 100 倍から 12,800 倍まで 2 倍段階希釈した陰性血清の反応性を、SARS-CoV N, および SARS-CoV NΔ121 に結合した IgG 量をペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体にて測定した。その結果、図 3 に示したように陽性血清では 3000 倍の希釈まで有意な反応

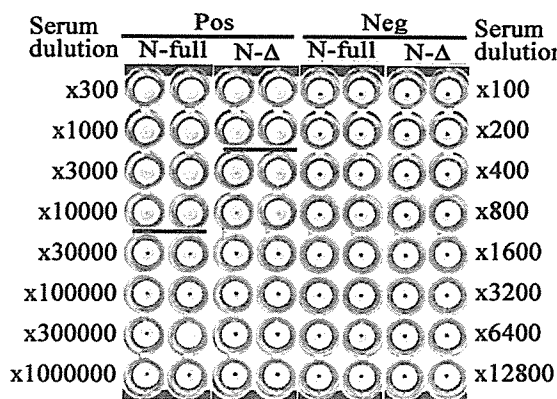
を認めた。また SARS-CoV N は SARS-CoV NΔ121 と比較して 2～3 倍の反応性を示した。陰性血清での非特異反応については 100 倍希釈では若干 (OD で 0.1 程度) の非特異反応が見られたが、200 倍以上の希釈ではバックグラウンドと同等の発色であり、非特異反応は見られなかった。



(図3 間接 ELISA 法での SARS-CoV N 抗原免疫ウサギ血清の検出限界と非特異反応の状況)

## 2) PA 法による SARS-CoV N 抗体の検出

マイクロプレートに抗ウサギ IgG 抗体を固定化して SARS-CoV N 免疫ウサギ血清とコントロールの陰性血清を添加して、IgG を補足させ洗浄したのち、SARS-CoV N, あるいは SARS-CoV NΔ121 組み換え蛋白を表層に固定化した Ha-Ny ビーズを添加して 20 分間反応させ沈降凝集パターンを観察した。



(図4 PA ビーズ法による抗 SARS-CoV N 抗原免疫ウサギ血清の検出限界と非特異反応の評価)

結果を図4に示す。陽性血清においては SARS-CoV N 抗原に対し 10,000 倍希釈まで陽性パターンをしめした。一方、SARS-CoV NΔ121 抗原に対しては 1,000～3,000 倍まで陽性パターンをしめした。間接 ELISA 法と同様に SARS-CoV N の方が高い反応性を示した。一方陰性血清についてはいずれの抗原においても最小希釈である 100 倍希釈においてすら非特異反応をしめさなかった。

## D. 考察

本研究班の初年度の研究において開発した SARS-CoV の組み換え蛋白は Ha-By を用いた PA 診断法のプラットフォームに乗せた場合も ELISA 法と同等、あるいはそれ以上の感度での SARS-CoV 特異的抗体の検出に適用できることが示された。今年度の研究においては昨年度すでに ELISA 系を用いた特異的 IgM 検出系が完成しているため、貴重な SARS 患者血清 (数量的、安全面での制約がある) を用いての評価は実験動物検体を持ちた評価が確定するまで使用しせず、SARS 抗原免疫ウサギ血清を用いた基礎試験を中心にして評価を実施した。その結果、SARS-CoV 特異的 IgG 抗体は ELISA 法に比べて PA 法では 3 倍から 10 倍の感度で検出することができた。一方、非特異的反応においては PA 法では最小希釈倍数である 100 倍希釈血清においても非特異反応が見られず、陰性、陽性をより容易に判定することができた。

今後、ヒト患者血清を用いた SARS-CoV 特異的 IgM 抗体の検出における評価、ELISA 法との比較を実施するが、すでに開発された Dengue ウイルスや日本脳炎ウイルスにおける PA 法の評価結果から類推すれば、本研究において開発した SARS-CoV N 組み換え蛋白を用いた PA 法でも同様の高い感度と特異性のある迅速診断法となる可能性がたかい。Ha-Ny ビーズを用いた PA

法では ELISA 法とことなり、点倍率の血清希釈でも非特異反応が低い利点があり、また全血でも試験を実施できるなどのシステム面での利点があり、フィールドやベッドサイドで経験の少ない術者や特別な装置や機器のない状況でも実施可能であるなどの優れた特性をもっており、信頼性の高い簡便迅速な SARS 血清検査として期待される。

#### E. 研究発表 (論文発表)

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Shigeru Morikawa, and Kouichi Morita: Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein as Antigen in a Novel Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol.14, 146-149, 2007

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

#### G. 謝辞

本研究はペンタックス株式会社バイオメディカル研究所の協力により実施した。