

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

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

分担研究者 福士秀悦 国立感染症研究所ウイルス第一部

協力研究者：水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、森川茂（同上）

研究要旨：安全、且つ迅速な SARS-CoV 感染の血清診断法の開発を目的して、SARS-CoV の外被蛋白質(SARS-CoV-S)を被った組換え水泡性口内炎ウイルスシュードタイプ(VSV-SARS-St19)を作製した。平成16年度は、抗 SARS-CoV ウサギ血清などを用いた検討から、VSV-SARS-St19 感染の特異性は SARS-CoV そのものの感染と同等であるという知見を得ることができた。平成17年度は、SARS アウトブレイク時の SARS-CoV 感染が確認されたヒト血清をもちいて、VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験を行った。VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験法はウイルスそのものを用いた中和試験法とほぼ同様の感度、特異性を有していた。本方法は短時間で安全に中和抗体価の測定ができることから、SARS の血清学的診断に有用であると考えられた。平成18年度は本研究で確立した VSV-SARS-St19 による中和抗体測定法をさらに発展させ、多検体を同時に処理可能な方法にするための検討を行った。従来、VSV シュードタイプの感染の有無は、緑色蛍光色素(GFP) の発光を指標に判定していたが、本研究で、これを分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)に置き換え、SEAP の活性を化学発光法で測定することにより、96 ウェルプレートを用いてシュードタイプの感染を迅速に且つ定量的に測定する方法を開発した。本方法により、一度に多くの血清サンプルの中和抗体価を同時に測定することが可能となるため、ハイスループットな血清学的診断に有用であると考えられた。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスである SARS コロナウイルス(SARS-CoV)は、既知のコロナウイルスとは異なる、新たに分離同定されたコロナウイルスである。このため、組換え蛋白質を用いた診断法の開発、ワクチンの開発、治療用抗血清の開発等が急務である。これまでの研究により、SARS-CoV 特異抗体は、発症後9日程度から検出できることが明らかになっている。ウイルス中和試験には生きた SARS-CoV そのものを用いるため、封じ

込めができる安全な検査設備(BSL3)が必要であり、しかも作業が繁雑で判定までの2-3日を要する。また、SARS アウトブレイク終息後、シンガポールと北京で相次いで実験室感染事故が起きたことから、ウイルスそのものを用いずに行える実験室診断体制を確立することが求められている。そこで、本研究では安全な SARS-CoV 感染の血清診断法の開発を目的して、SARS-CoV の外被蛋白質(SARS-CoV-S)を被った組換え水泡性口内炎ウイルスシュードタイプ(VSV-SARS-St19)を作製した(図1)。

VSV-SARS-St19 は一回のみ細胞へ感染可能なので生物学的封じ込めの観点から安全性が高い。平成16年度は、抗 SARS-CoV ウサギ血清などを用いた検討から、VSV-SARS-St19 感染の特異性は生きた SARS-CoV そのものと同等であるという知見を得た。平成17年度は、SARS-CoV 感染が確認されたヒト血清を用いて、VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験を行い、従来のウイルスそのものを用いた中和抗体測定法との比較を行った。VSV-SARS-St19 を用いたウイルス中和試験法はウイルスそのものを用いた中和試験法とほぼ同様の感度、特異性を有していた(図1)。この VSV-SARS-St19 による中和試験法をさらに発展させて、多検体を同時に処理可能にするため、平成18年度は、VSV-SARS-St19 の GFP 遺伝子を分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子に置き換えた VSV シュードタイプ(VSV/SEAP-SARS-St19)の作製を試みた。さらに、96 ウェルプレートを用いて SAEP の活性を化学発光法で測定し、多検体を同時に定量的に測定する方法について検討した。

B. 研究方法

1) VSV/SEAP-SARS-St19 の作製

VSV-G 遺伝子を SEAP 遺伝子に置き換えた VSVΔG*/SAEP-G を種ウイルスとして用いた(図2)。VSVΔG*/SAEP-G を SARS-CoV-S タンパク質を発現する 293T 細胞へ接種。24 時間後に培養上清中の VSV/SEAP-SARS-St19 を回収した。

3) 血清サンプル

VSV/SEAP-SARS-St19 の中和試験法を検討するため、中和抗体陽性コントロール血清として、バキュロウイルスタンパク質発現系で作製した組み換え SARS-CoV-S タンパク質をウサギに免疫して得られた抗 SARS-CoV-S 血清(anti-SARS-S)、あるいは UV 不活化 SARS-CoV で免疫したウサギ抗

SARS-CoV 血清(anti-SARS-CoV)を用いた。陰性コントロール血清として SARS-CoV-N タンパク質に対するウサギ抗血清を用いた。また、国立感染症研究所職員よりインフォームド Consent のもとに採取された血清を用いて、健康人血清中の非特異的な中和活性の有無について検討した。

2) VSV/SEAP-SARS-St19 感染の検出方法

VSV/SEAP-SARS-St19 と段階希釈した血清サンプルを混和し、37℃、1 時間反応後、その混和液を Vero E6 細胞に接種。16-18 時間後培養上清にアルカリフォスファターゼ基質と化学発光試薬を加え、37℃で 30 分インキュベート。マイクロプレートルミノメーター(プロメガ社製)で発光強度を測定した。

C. 結果

従来、VSV シュードタイプの作製は、種ウイルスとして VSV-G 遺伝子の代わりに GFP 遺伝子を組み込んだ VSVΔG*-G を用いていたが、本研究では VSV シュードタイプの感染を SEAP 活性により定量的に測定するため、VSV-G 遺伝子を SEAP 遺伝子に置き換えた VSVΔG*/SAEP-G を種ウイルスとして用いた(図2)。SARS-CoV-S タンパク質を発現する 293T 細胞へ VSVΔG*/SAEP-G を感染させ S タンパク質でシュードタイプさせた VSV/SEAP-SARS-St19 を得た。この VSV/SEAP-SARS-St19 を標的細胞である Vero E6 細胞に感染させ、培養上清中に分泌される SEAP 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(図3)。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。VSV/SEAP-SARS-St19 の感染の特異性を調べるため、ウサギ抗血清を用いて VSV/SEAP-SARS-St19 の中和試験を行った(図4)。陰性コントロールとして用いた SARS-CoV-N タンパク質に対するウサギ抗

血清は VSV/SEAP-SARS-St19 の感染を阻害しなかったが、UV 不活化 SARS-CoV で免疫したウサギ抗血清 anti-SARS-CoV、およびバキュロウイルス発現系で作製した SARS-CoV-S タンパク質で免疫したウサギ抗血清 anti-SARS-S は VSV/SEAP-SARS-St19 の感染を阻害した。次に健康人から採取された血清サンプルを用いて VSV/SEAP-SARS-St19 の中和試験を行ったところ、40 倍希釈でもこれらの血清に非特異的な中和活性はみられなかった（図 5）。これらの結果から、VSV/SEAP-SARS-St19 の感染は SARS-CoV-S タンパク質に特異的な感染であり、健康人の血清による非特異的な中和活性は低いことが示された。

D. 考察

VSV シュードタイプによる中和試験はウイルスそのものを用いないため、安全性に優れている。従来の VSV シュードタイプは、GFP 遺伝子が組み込まれていた。このシュードタイプによる中和抗体測定方法は検体数が少なく迅速に判定する場合に優れた手法であった。しかし、感染を定量的に判定するためには、1 ウェルごとの細胞の写真撮影と解析ソフトによる GFP 陽性細胞数のカウントが必要であることから、多くの検体を同時に処理するという点においては、必ずしも優れた手法とは言えないのが現状であった。本研究では、これを多検体同時処理可能なものにするため、GFP を SEAP に置き換えた VSV/SEAP-SARS-St19 を作製した。このシュードタイプの感染性はマイクロプレートルミノメーターで 96 ウェルプレートと同時に解析可能であった。VSV/SEAP-SARS-St19 の感染は SARS-CoV-S タンパク質特異的であり、健康人血清による非特異的な中和活性も低かったことから、VSV/SEAP-SARS-St19 は

SARS-CoV 感染の中和試験のハイスループット化に有用であると考えられた。

E. 結論

- (1) 本研究で SEAP を発現する VSV シュードタイプ VSV/SEAP-SARS-St19 を作製した。
- (2) VSV/SEAP-SARS-St19 の標的細胞への感染は SARS-CoV-S タンパク質特異的であったことから、SARS-CoV 感染の中和試験に有用であると考えられた。
- (3) 本研究により、一度に多くの血清サンプルの中和抗体価を同時に測定することが可能となった。

F. 論文発表

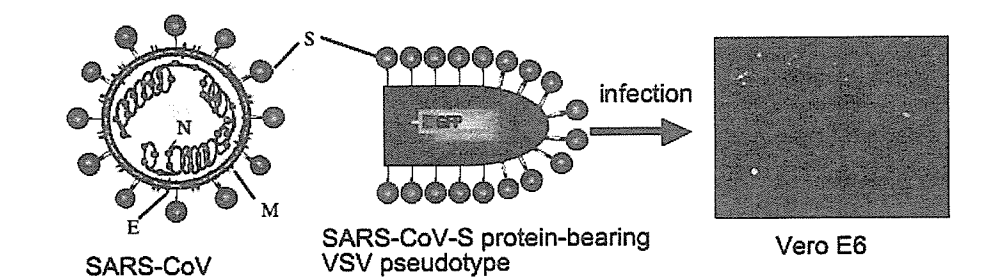
Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kanaji Y, Kurane I, Taguchi F, Morikawa S. Evaluation of a Novel Vesicular Stomatitis Virus Pseudotype-Based Assay for Detection of Neutralizing Antibody Responses to SARS-CoV. J Med Virol.2006;78, 1509-1512.

Fukushi S, Mizutani T, and 5 other authors. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein. Adv Exp Med Biol. 2006;581:293-296.

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

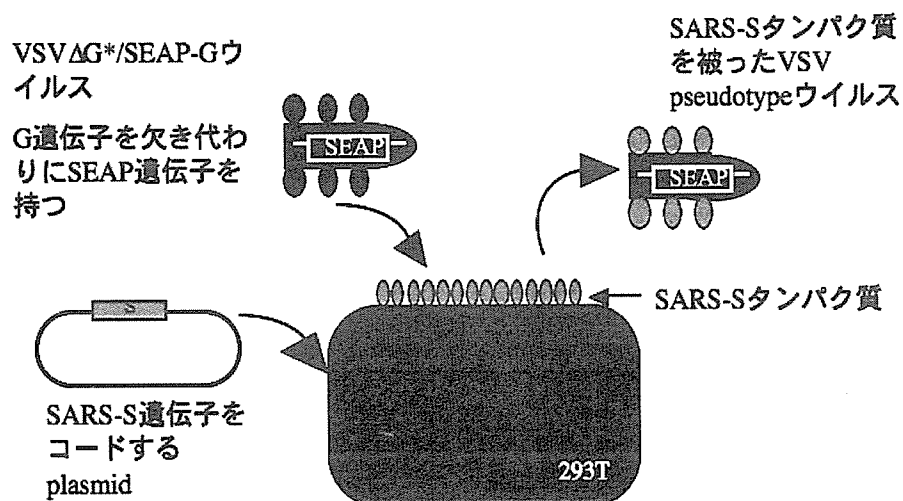
(図1) VSVシュードタイプを用いた安全で迅速なSARS-CoV中和抗体測定法の開発



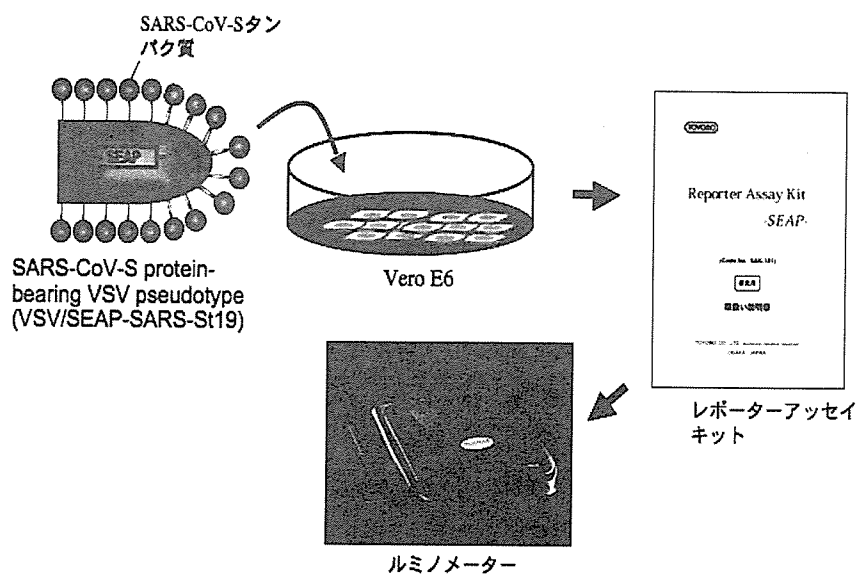
ヒト血清サンプルを用いた中和試験（感度：97%，特異性：86%）

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

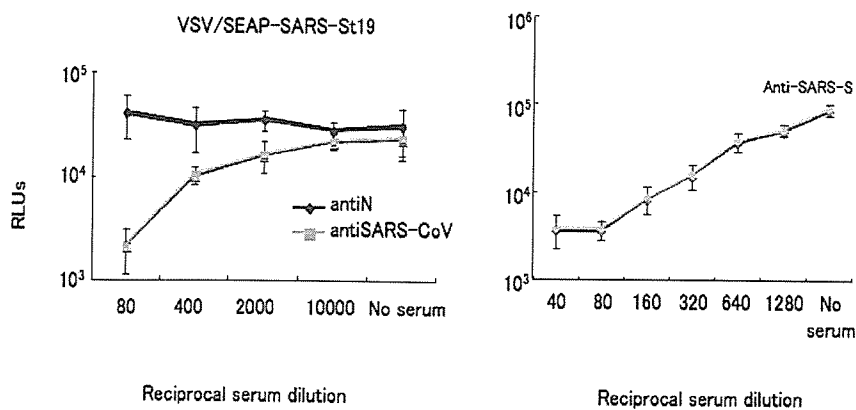
(図2) 分泌型アルカリフォスファターゼ (secreted alkaline phosphatase; seap) を持ったVSV-SARS-Sシュードタイプの作製



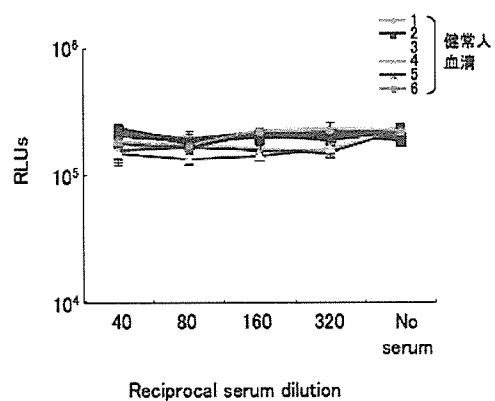
(図3) SEAPを持ったVSV-SARS-Sシュードタイプの感染性の解析



(図4) VSV/SEAP-SARS-St19の感染はSARS-Sに対する抗体で中和された



(図5) VSV/SEAP-SARS-St19の感染は健康人血清で非特異的に中和されなかった



厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究
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

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：重症急性呼吸器症候群ウイルス（SARS-CoV）のレセプターである2型アンギオテンシン転換酵素（ACE2）を表面に被ったシュードタイプバキュロウイルスは、SARS-S蛋白質を発現する細胞にのみ特異的に感染し、遺伝子を導入できた。一方、SARS-S蛋白質を表面に被ったシュードタイプバキュロウイルスはACE2発現細胞へ感染性を示さなかった。ACE2を表面に被ったシュードタイプ水疱性口内炎ウイルス（VSV）および組換えVSVは、SARS-CoVのスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ特異的に感染し、この感染は抗ACE2抗体および抗SARS-S抗体で中和された。

A. 研究目的

SARS-CoVの中和抗体を安全に測定するため、SARS-CoVのスパイク蛋白質を被ったシュードタイプウイルスがレトロウイルスや水疱性口内炎ウイルス（VSV）で開発されている。本研究は、SARS-CoVの受容体であるACE2を被ったシュードタイプバキュロウイルスおよびシュードタイプVSV、組換えVSVを作製し、安全で迅速なSARS-CoVの中和抗体測定系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

まず、バキュロウイルスの本来のエンベロープ蛋白質であるgp64の遺伝子を相同組換えにより欠損させたウイルスゲノムを作製し、さらにこの組換えウイルスゲノムの多角体遺伝子領域に、多角体プロモーターとCAGプロモーターの下流にそれぞれACE2遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ組換えウイルスゲノムを作製した（図1）。

この組換えゲノムを昆虫細胞に導入して培養上清中からシュードタイプウイルスを回収し、濃縮・精製した。

これまでにレトロウイルスを用いた

SARS-CoVシュードタイプウイルスの作製において、スパイク蛋白質のcytoplasmic domainが適切な長さでなければ効率よくウイルスに取り込めず、そのため感染性が得られないという報告がある。また我々もこれまでに麻疹ウイルスのレセプターの一つであるSLAM蛋白質を被ったシュードタイプバキュロウイルス作製において、全長遺伝子を発現させたSLAMではウイルスの取り込み効率が悪く、cytoplasmic domainを一部欠損させたSLAMでは効率よくバキュロウイルスに被らせることを明らかにしている。そのため、本研究においてもSARS-CoVスパイク蛋白質のcytoplasmic domainを短くしたコンストラクトを同時に作製し、組換えウイルスゲノムを作製した。この組換えゲノムを昆虫細胞に導入して培養上清中からシュードタイプウイルスを回収し、濃縮・精製した。ウェスタンブロットによってシュードタイプウイルスのSARS-CoVスパイク蛋白質の取り込みを、またルシフェラーゼ活性により哺乳動物細胞への遺伝子導入を検討した。

ACE2を被ったシュードタイプVSVおよびACE2遺伝子を組み込んだ組換えVSVも定法

に従って作製し（図2）、ウェスタンブロットによってシュードタイプウイルスのACE2蛋白質の取り込みを、またルシフェラーゼ活性もしくはGFPの発現を指標に哺乳動物細胞への遺伝子導入を検討した。また中和抗体測定系への応用として抗ACE2抗体および抗SARS-S抗血清による感染中和も検討した。

C. 研究結果

ACE2シュードタイプバキュロウイルスゲノムを昆虫細胞に導入したところ、昆虫細胞表面にACE2が発現されることを確認した。また、その培養上清中より回収したACE2シュードタイプウイルスからは、ACE2が検出され、ACE2が取り込まれていることが示された。一方、バキュロウイルス本来のエンベロープ蛋白質であるgp64は検出されなかった（図3）。

このACE2シュードタイプウイルスの哺乳動物細胞への感染性を評価したところ、SARS-CoVのスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ感染することができ、発現しない細胞には感染できないことが示された（図3）。さらに、抗ACE2抗体による中和試験を行った結果、特異的な中和が認められた。

SARS-Sのシュードタイプバキュロウイルスゲノムを昆虫細胞に導入したところ、昆虫細胞表面にSARS-Sが発現されることを確認した。また、cytoplasmic domainを一部欠損させたSARS-Scyto7でも同等量発現されることが確認できた。その培養上清中より回収したSARS-Sシュードタイプウイルス（AcΔ64/SARS-S/CAlucおよびAcΔ64/Scyto7/CAluc）からは、SARS-Sが検出され、SARS-Sが取り込まれていることが示された。一方、バキュロウイルス本来のエンベロープ蛋白質であるgp64は検出されなかった（図4）。

このSARS-Sシュードタイプウイルスの哺乳動物細胞への感染性を評価したところ、

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

これらのシュードタイプバキュロウイルスは親ウイルスを増殖させるためにgp64発現プラスミド存在下で増殖させると継代を重ねるうちにgp64遺伝子を取り込んで自立増殖してしまうことが分かった。そのため、現在までのところ、このシュードタイプバキュロウイルスを調整するのはかなりの労力と費用がかかってしまう。そのため次に、同様にシュードタイプウイルスのシステムとして応用されているVSVを用いてACE2を被ったシュードタイプウイルス、そしてゲノムにACE2を持たせてSARS-S発現細胞下では特異的に自立増殖出来るような組換えVSVを作製した。その結果、シュードタイプVSVも組換えVSVも同様にウイルス粒子にACE2の取り込みが確認でき、またこれらのウイルスはとても特異性も感染性も高いことが示された。さらに抗体および抗血清における中和活性を調べると濃度依存的に抗ACE2抗体でも抗SARS-S抗血清でも高い中和活性が見られた（図5）。また組換えVSVの特異的な感染性はシュードタイプVSVよりも更に高く、またSARS-S発現細胞では自身が粒子表面に被っているACE2を介して自立増殖していくことも観察された。

D. 考察

ACE2を被ったシュードタイプバキュロウイルスおよびシュードタイプVSV、さらに組換えVSVはSARS-CoVのスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ特異的に感染することが示された。また組換えVSVはSARS-Sを発現する細胞では特異的に感染拡大が観察された。

さらにVSVはRNAウイルスであるために、

親ウイルスを増幅させる際に用いるプラスミド DNA は取り込まず、継代を繰り返しても組換えが起こることはない。またこれらのウイルスは SARS-S を発現していない細胞には全く感染性を示さず、利用する上でも安全である。

これらのシュードタイプウイルスおよび組換えウイルスは、迅速かつ安全な中和抗体検出系への応用だけでなく、SARS-CoV 感染細胞にのみ遺伝子を導入することのできるターゲティングベクターへの応用も可能であると考えられる。

E. 結論

1. ACE2 を被ったシュードタイプバキュロウイルス、シュードタイプ VSV および ACE2 遺伝子をゲノムとして持ち ACE2 を被った組換え VSV を作製した。
2. 抗 ACE2 抗体および抗 SARS-S 抗血清によりこれらのウイルスは特異的に中和されることが分かった。
3. 今後、実際の感染患者血清を用いて、他の測定系と共に中和抗体測定感度を検討して行く予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitagawa Y., Tani H., Limn C-K., Matsunaga T., Moriishi K., and Matsuura Y.
Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses. *J. Virol.*, **79**:3639-3652 (2005).

Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y.

Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.*, **79**, 2847-2858 (2005).

2. 学会発表

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、松永朋子、田鍬修平、森石恆司、松浦善治：バキュロウイルスを用いたターゲティングベクターの開発、第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日

阿部隆之、森石恆司、高久洋、田村慎一、審良静男、松浦善治：バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構、同上

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

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、同上

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

図 1

シュードタイプバキュロウイルスの作製法

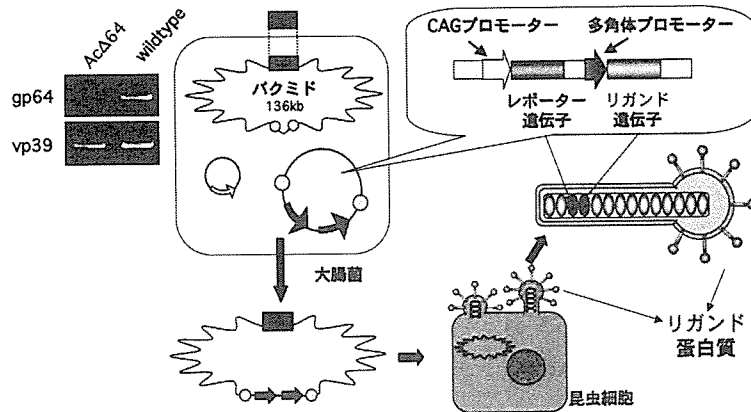


図 2

シュードタイプウイルス(ACE2pv)と組換えウイルス(ACE2rv)

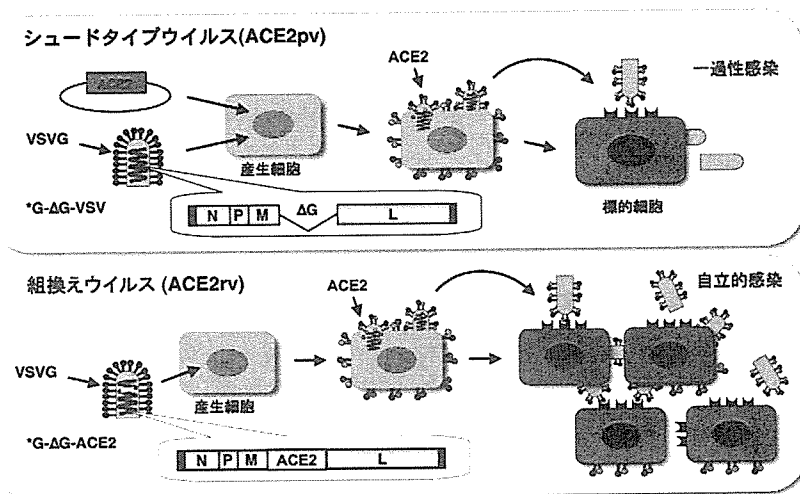


図 3

ACE2シュードタイプバキュロウイルス

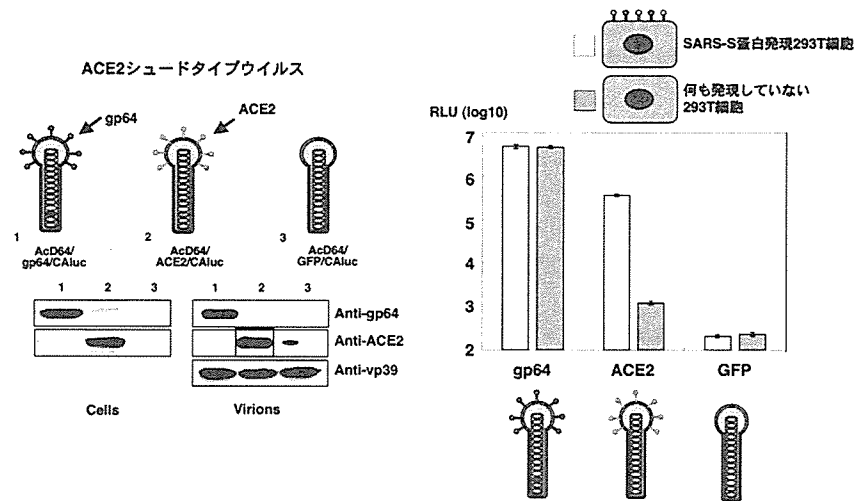


図 4

SARS-Sシュードタイプウイルスの性状

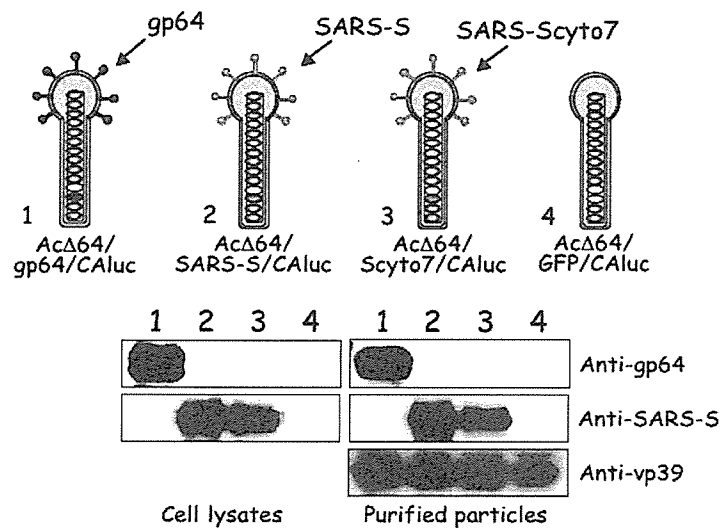
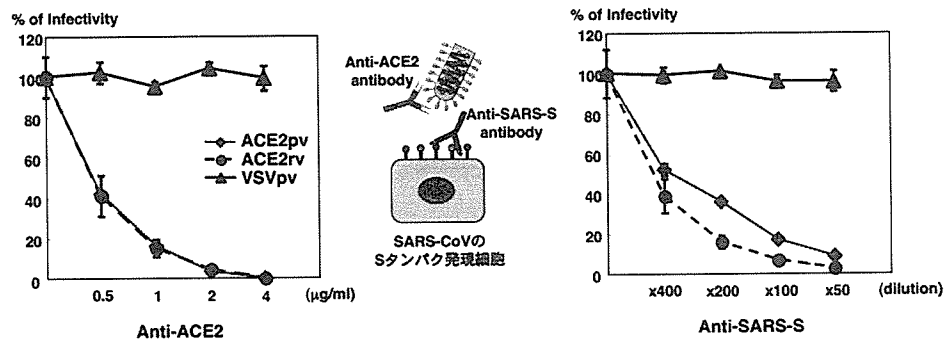


図 5

ACE2pvおよびACE2rvの感染は 抗ACE2抗体、抗SARS-S抗体により中和される



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

SARS コロナウイルスの迅速抗原検出キットの開発

分担研究者： 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所副所長兼感染症部長
研究協力者： 加瀬哲男 大阪府立公衆衛生研究所
岡田全司 国立療養所近畿中央病院臨床研究センター
生田和良 大阪大学微生物病研究所
横田恭子、大西和夫、高木弘隆 国立感染症研究所

研究要旨：SARS コロナウイルス（SARS-CoV）の抗原を10分以内に検出するイムノクロマト法を開発した。N蛋白に対する2種類のマウスモノクローナル抗体を使用し、1種類はメンブレンへの固相化抗体、別の1種類はラテックスへの感作抗体として用いると、高感度の迅速抗原検出キットを作製することができた。このキットは、ヒトのコロナウイルスや他のウイルス、細菌には反応せず、SARS-CoVに高い特異性を示した。重症の肺炎患者を、臨床現場で鑑別診断するのに有用なキットと考えられた。

A. 研究目的

感染症が疑われる患者を診察中に診断することが医療関係者の長年の夢であったが、イムノクロマト法が実用化されると、これが現実のものとなった。ウイルス感染症に限っても、すでにインフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ロタウイルスなどに対するイムノクロマト法が開発され、医療現場で広く用いられている。この研究は、SARS コロナウイルスによる感染を迅速診断するため、イムノクロマト法による迅速抗原検出キットを開発する目的で実施した。

B. 研究方法

ウイルスと細胞：SARS コロナウイルスのHKU39849株とFFM-1株を実験に用いた。抗原液の作製、中和試験のためVero E6細胞を用いた。

抗体：8種類の抗体を実験に供した（表1）。

E蛋白のペプチドをウサギに免疫して作製した抗ペプチドポリクローナル抗体を1種類、S蛋白に対するマウスモノクローナル抗体を5種類、N蛋白に対するマウスモノクローナルを2種類用いた。

SARS-CoV 抗原液の作製：イムノクロマト法の性能を調べるため、SARS-CoV 抗原液を作製した。抗原液（A）は、SARS-CoVをVero E6細胞に接種、次いで24時間後に培養上清を回収し、2,000rpmで遠心した後の上清を使用した。抗原液（B）は、感染細胞をCell lysis bufferに溶かし、10,000rpmで遠心後、上清を回収したものを使用した。

Indirect-ELISA：96穴ELISAプレートに10 μ g/well（炭酸バッファー、pH9.6）の量で不活化抗原（B）をコートし、4℃で16時間放置した。洗浄後、イムノブロックで37℃、2時間ブロッキングを行った。洗浄後、20、5、1.25、0.31、0.08、0.02 μ g/mlに希釈した各抗体を100 μ l/wellの量で

37℃、1 時間反応させ、次いで 4,000 倍希釈した抗マウスまたは抗ウサギ IgG (TW1E の場合) HRP 標識抗体 (100 μ l/well) を 37℃、1 時間反応させた。洗浄後、100 μ l の TMBZ(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 反応液を各 well に加え、室温で 10 分放置した後、100 μ l の 1M H_3PO_4 を添加して反応を停止し、415nm での吸光度を測定した。

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

イムノクロマト法:

(A) 金コロイド法

Hi-Flow135 ろ紙 (ミリポア) に 2mg/ml (5mM ホウ酸緩衝液) の濃度の抗体 (D4、3A2) をスポットしハーフストリップろ紙を作製した。同じ抗体を用い、金コロイド標識抗体も作製した。ウイルス抗原液と金コロイド標識抗体をマイクロチューブ内で反応させた。そこにハーフストリップろ紙の先端を浸漬し、10 分後に判定した。

(B) ラテックス粒子法

金コロイドの代わりラテックス粒子に抗体 (D4、3A2、SKTO8、SKTO9) を標識した。ろ紙にはそれぞれの抗体を固相化し、固相化抗体と感作ラテックス粒子の抗体を、3A2 と D4、SKTO8 と SKTO9 (ある

いはその逆) の組み合わせでイムノクロマトを行った。

C. 研究結果

(1) 抗体の性状

実験に用いた抗体の種類を表 1 に示した。TW1E は平成 16 年度の研究で作製した E 蛋白ペプチドに対するウサギのポリクローナル抗体で、S 蛋白に対する抗体はすべて平成 17 年度に用いたマウスモノクローナル抗体であった。平成 18 年度の研究で、2 種類の N 蛋白に対するマウスモノクローナル抗体を新たに用いた。平成 17 年度の研究で、2G3、3A2、3E3 は中和活性を有することを証明した。

(2) Indirect-ELISA (平成 17、18 年度研究成果)

Indirect-ELISA により各抗体の抗原液 (B) に対する反応性を調べた (図 1)。3E3、3A2、SKTO8 の ELISA 価は非常に高かったが、2G3、D4、2E3B5 のそれは、陽性ではあるが極めて低かった。TW1E は、ほとんど反応しなかった。SKTO9 は試験できなかったが、SKTO8 とほぼ同様の反応性を示すものと推測される。

(3) Sandwich ELISA (平成 17 年度研究成果)

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

(4) イムノクロマト法

金コロイド法による平成 17 年度の研究で、固相化抗体に 3A2 を、金コロイド標識抗体として D4 を用いる組み合わせで高い感度を得られた。しかし、PBS や sample buffer だけでも非特異的なバンドが形成され、特異バンドとの区別が困難であった (平

成 17 年度研究報告書)。

そこで、平成 18 年度はラテックス粒子法を導入し、さらに新たに N 蛋白に対するモノクローナル抗体を 2 種類 (SKTO8、SKTO9) 加えてイムノクロマトを行った。3A2 と D4 の組み合わせでも抗原液 (B) で特異的なバンドが形成されたが、SKTO8 と SKTO9 の組み合わせで最も明瞭なバンドが観察された (図 3)。固相化抗体に SKTO8 を、ラテックス標識抗体に SKTO9 を用いた組み合わせでも、またその逆の組み合わせでも感度に大きな違いは認められなかった。

SKTO8 と SKTO9 を用いたイムノクロマト法の特異性を調べるため、呼吸器系の細菌 21 種類、ウイルス 9 種類について反応性を検討した (表 2)。このイムノクロマト法は、調べた細菌、ウイルスには全く反応せず、特異性の高い方法であることが証明された。

大阪府立公衆衛生研究所において抗原液 (A) を用い、上記イムノクロマト法の感度を定量的に調べた (図 4)。TCID₅₀ による感染価を基準にすると、FFM1 株よりも HKU39849 株に対してより検出感度が高かった。

国立感染症研究所におけるイムノクロマト法の性能評価で、ヒトのコロナウイルスに対する反応性、及び HKU39849 株に対する感度を定量的に調べた (図 5)。このイムノクロマト法は、ヒトのコロナウイルスには反応せず、どちらの抗体の組み合わせでも、10⁶ pfu/ml 以上の SARS-CoV の感染価があれば検出できた。

D. 考察

イムノクロマト法では、メンブレンに固相化する抗体と、金コロイドあるいはラテックス粒子を感作する抗体の 2 種類の抗体が必要となってくる。そこで、各種抗体を

準備し、Indirect-ELISA でそれら抗体の反応性を調べ、Sandwich ELISA で適切な抗体の組み合わせを検討した。

Indirect-ELISA では、強く反応するもの (3E3、3A2、SKTO8) と弱い反応しか示さないもの (TW1E、2G3、D4、2E3B5) の大きく 2 群に分かれた (図 1)。しかし、Sandwich ELISA では、どのヘテロの組み合わせでも強い反応性が見られた (図 2)。これらヘテロの組み合わせにより、高感度のイムノクロマト法の開発が可能と考えた。

そこで、平成 17 年度の研究では高い感度を示すと考えられる 3A2 (固相化抗体) と D4 (金コロイド標識抗体) の組み合わせでイムノクロマトを作製した。しかし、バッファーだけでも抗体を塗布した位置にバンドが形成された。この非特異的反応を除去することと感度を上げることが課題と考えられ、平成 18 年度の研究では金コロイドの代わりにラテックス粒子を用い、2 種類の N 蛋白 (SKTO8、SKTO9) に対する抗体を新たに導入した。

SKTO8 と SKTO9 を除く抗体を用い、種々の組み合わせでラテックス粒子によるイムノクロマトを作製した。しかし、3A2 と D4 以外の組み合わせでは非特異反応を除去することができなかった。SKTO8 と SKTO9 の組み合わせでは高い感度と特異性が得られ、実用化が可能と考えられた。

SARS 患者の検体が入手できないので、臨床現場での有用性は今後の検討課題である。しかし最近、大阪で SARS 疑いの患者発生があり、緊急の検査要請があったため、このキットを用いて鑑別診断を行った。結果は陰性であり (最終的には PCR 法で確認した)、混乱を早期に食い止めるのに役立った。今後 SARS の患者が発生する可能性は少ないものと推測されるが、SARS を疑わせる重症の肺炎患者が発生した場合、このキットは早期の鑑別診断に有用であると思

われた。

E. 結論

N 蛋白に対するマウスモノクローナル抗体を2種類使用し、これらをラテックス粒子に感作することにより高感度で特異性の高いSARS-CoVに対するイムノクロマト法を開発することができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Okada, M., Takemoto, Y., Okuno, Y., Hashimoto, S., Yoshida, S. et al. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. Vaccine 23:2269-2272. 2005.
2. Okada M., Takemoto, Y., Okuno, Y., Hashimoto, S. et al. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/Hu mouse models. Adv Exp Med Biol. 581:561-566. 2006
3. Okada M., Okuno, Y., Hashimoto, S. et al. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/Hu mouse models. Vaccine. in press

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1.SARS-CoVに対する抗体

クローン名	由来種	認識蛋白	モノクローナル抗体/ポリクローナル抗体
TW1E	Rabbit	E蛋白	抗ヘプタドネリコウイルス抗体
D4	Mouse	S蛋白	モノクローナル抗体
2G3	Mouse	S蛋白	モノクローナル抗体
3A2	Mouse	S蛋白	モノクローナル抗体
3E3	Mouse	S蛋白	モノクローナル抗体
2E3B5 (市販品)	Mouse	S蛋白	モノクローナル抗体
SKOT8	Mouse	N蛋白	モノクローナル抗体
SKOT9	Mouse	N蛋白	モノクローナル抗体

図1.Indirect-ELISAによる抗体の反応性

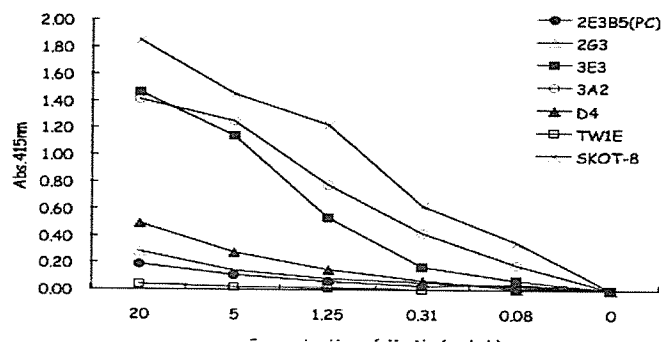


図2.Sandwich-ELISAによる抗体の反応性

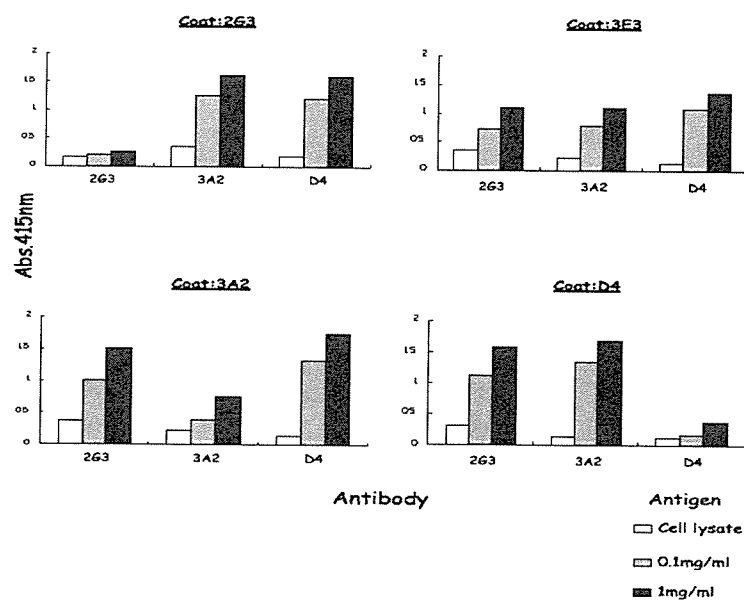


図3.イムノクロマトの結果 (1)

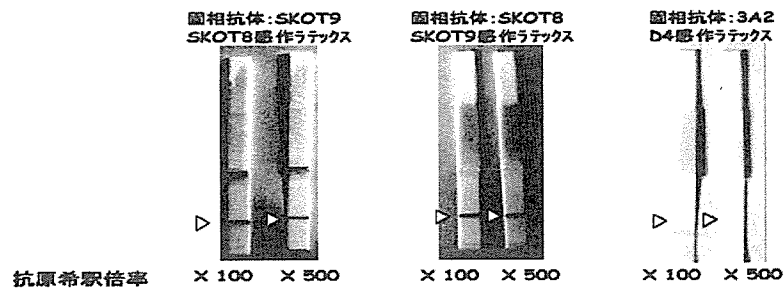


表2. 交差反応試験に用いた菌種、ウイルス種

リステリア菌	カンジダ	CB5
プロテウス菌	大腸菌	Polio3
緑膿菌	腸球菌	Echo7
セラチア	インフルエンザ菌	HSV-1
黄色ブドウ球菌	肺炎桿菌	Adeno3
表皮ブドウ球菌	肺炎球菌	A/New Caledonia/20/99 (H1)
B群レンサ球菌	A群レンサ球菌	A/Wyoming/3/03 (H3)
C群レンサ球菌	肺炎マイコプラズマ	B/Yamanashi/166/98
F群レンサ球菌	ジフテリア菌	R(H5N1)
G群レンサ球菌	百日咳菌	
ムータンス菌		

図4.イムノクロマトの結果 (2)

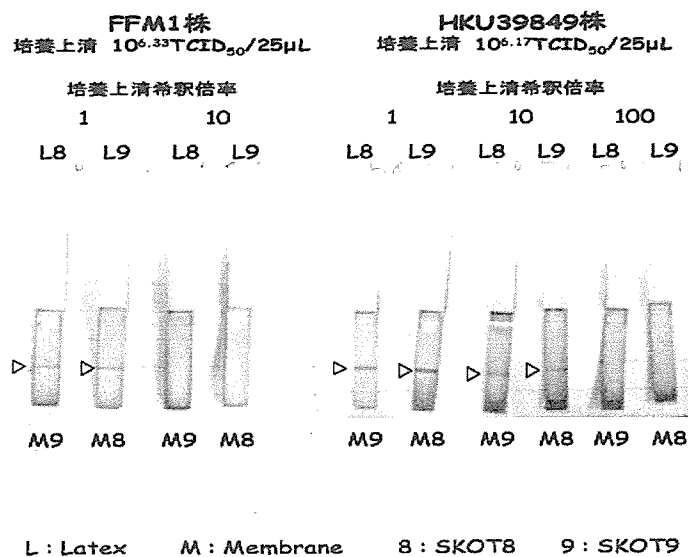
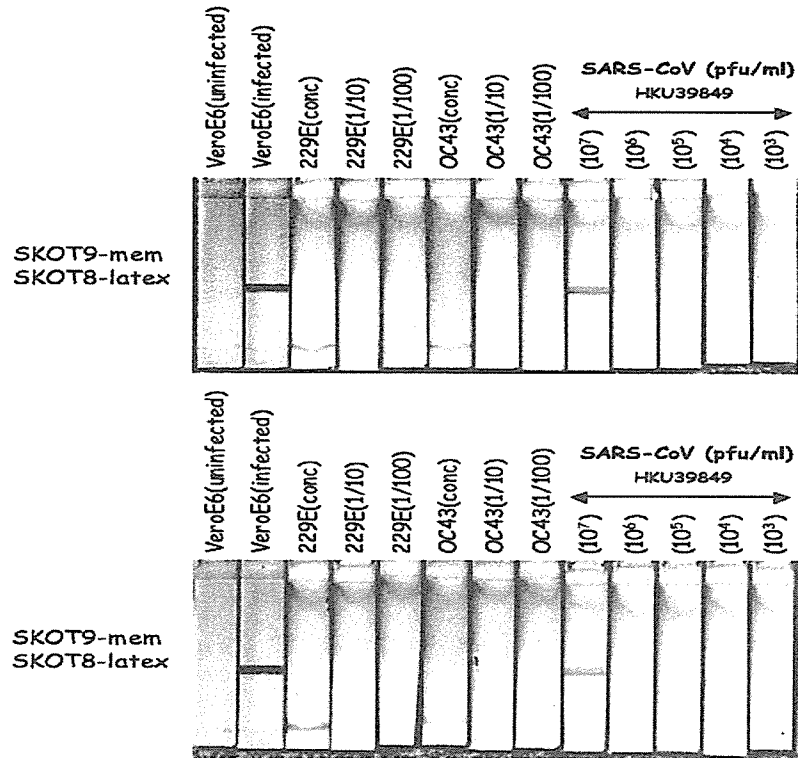


図5.イムノクロマトの結果 (3)



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

SARS/RT-LAMP 検出試薬開発と臨床評価
国立感染症研究所ウイルス第3部 部長 田代真人

研究要旨 感度と特異性が高く、高額機器や特殊技術が不要で、短時間で簡便に、SARS コロナウイルス感染を診断できる安価な診断キットの開発・実用化を行った。栄研化学が基礎技術を開発した LAMP 法を、SARS コロナウイルスの遺伝子検出に応用し、基礎実験、臨床検体を用いた性能試験を行った。初期の SARS 患者の血清・血漿を検体として、65 度の恒温槽を用い、30 分程度で、簡便に検査と判定ができ、現行 RT-PCR に優る感度と特異性を持つことが示された。

[研究の背景] 2003 年 11 月以来半年にわたって世界を震撼させた SARS は現時点では患者発生は報告されていない。しかし、SARS コロナウイルスの起源は依然不明であり、夏期には消えているが毎年冬になると出現を繰り返すヒトコロナウイルスの性状などから類推して、冬期に SARS の再出現が危惧されている。社会への蔓延を未然に防ぐためには、SARS 患者ないしはウイルス感染者およびその可能性があるものについては、速やかに入院隔離、停留等の措置、行動制限の指示などの行政対応が必要となる。そのためには、検疫所、医療現場、保健所などの第一線において、これらの患者、感染者の早期発見、検知、確認が必須となる。

一方、冬季にはインフルエンザが流行し、多数の重症例を含む数百万人レベルの発熱・呼吸器症状を呈する患者が発生するが、SARS の初期症状はインフルエンザと区別が付かないために、SARS 感染患者とインフルエンザ患者の臨床的な鑑別は困難である。

現在のところ、インフルエンザに対する迅速診断キットは普及しているが、その感

度、特異性には問題も多く、更にインフルエンザと診断されても SARS を否定できない。一方、SARS の初期患者に対するウイルス学的診断としては、ウイルス遺伝子を増幅して検出する RRT-PCR およびそれを自動化・定量化した real-time PCR が用いられているが、何れも感度は 20~50%程度で、SARS の確定診断あるいは否定には信頼にたらない。更に、検査結果が出るまでに、RT-PCR では半日以上も掛かり、後者では 2 時間以内に結果は出るものの、1 千万円前後の高額な特殊機器を必要とする。

このような状況から、SARS 再出現の有無に関わらず、多数のインフルエンザ様患者について SARS を否定することは困難な状況であり、第 1 線の現場では大きな混乱が生じることが懸念されている。

そこで、第 1 線の現場において、初期の SARS 感染患者について、高い感度と特異性を持って診断できる診断方法の確立が緊急課題となっている。さらに、現場において、短時間で、高額な特殊機器や訓練を必要とせず、簡単に実施しうる利便性が高く、また低価格で途上国でも十分に使用しうる、迅速簡易診断キットの開発が WHO をはじ