

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16～18年度 総合研究報告書
平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19(2007)年3月

主任研究者

切 替 照 雄

目 次

I.	H16-H18 年度総合研究報告書		
	ヒト型抗 SARS 中和抗体の開発研究	切替 照雄	1
II.	H18 年度総括研究報告書		
	ヒト型抗 SARS 中和抗体の開発研究	切替 照雄	15
III.	H18 年度分担研究報告書		
	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	切替 照雄	27
	中国との研究調整	笹月 健彦	33
	ウイルス中和活性の測定	田代 眞人	37
	SARS ウイルス抗原ペプチドを用いた迅速診断キットおよびワクチンの開発	七條 茂樹	41
	ヒト型ウシを用いたヒト型抗体の作成	石田 功	45
IV.	研究成果の刊行物・別刷	51
V.	参考資料	巻末

Ⅱ. 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、ヒト抗体産生ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト抗体の開発を行うことである。本年度は、昨年度までに同定した、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、ヒト抗体産生マウス、通常ウサギへの免疫実験、さらにヒト抗体産生ウシ免疫の予備実験として野生型ウシの免疫実験を実施し、得られた IgG の *in vitro* SARS-CoV 中和試験を実施した。またヒト抗体産生ウシの免疫実験を開始した。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い、本年度中に実験開始予定である。

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)

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中和抗体の開発を目指す。

昨年度までに、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、表面抗原である spike 蛋白質の全領域について、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。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い、得られた抗原候補をヒト抗体産生マウス、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、ヒト抗体大量生産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た。

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 誘導体由来の組換え蛋白質は TEV プロテアーゼにより、pQE2 誘導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 3)。

3. 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。本年度は昨年度までに構築した測定系を改良した。すなわち検体として使用する抗血清より IgG を精製して試験に共することで非特異的な抑制反応の減弱を行った。

4. 中国との研究調整

昨年度までに、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

昨年度までに、S, N, M および E の各 SARS-CoV 構成蛋白質由来の合計 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

(図1)。これらの配列をそのまま利用したものや合成した他、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(図2)。

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。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(図3)。

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 μ 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：昨年度までの結果を元に、100匹規模で、S-c、S-d および N の3種類の抗原についてヒト抗体産生マウスの免疫を実施し、ELISA による評価で良好な抗体価上昇を得ることができた。

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。2種類のアジュバントシステムを使用し、各抗原について抗体価の上昇に応じて、6-9回の免疫を完了し、以下の SARS-CoV 中和試験に供した(図5)。

6. 得られたヒト型抗体産生マウス、通常ウサギおよび野生型ウシの IgG 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、通常ウサギ、野生型ウシで作成した IgG の中和活性を測定した。昨年度まで本試験は血清を希釈し、試験に共していたが、その後の検討で血清中に非特異的なプラーク形成阻止活性が存在することが明らかとなったため、アフィニティ精製により IgG 標品を調整し、試験に供するという改良を行った。ウサギ、ヒト抗体産生マウス、野生型ウシの IgG 標品は S-c と名付けた Spike 由来断片で、ウイルス中和活性を認めた(図6)。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。これらの結果を元にヒト抗体産生マウス由来抗体を利用して、サルを用いた SARS-CoV 感染モデルでの抗体の効果の評価の可能性を検討した。*in vivo* でウイルス中和を実施するためには NT50 値の少なくとも10倍濃度の抗体を投与する必要があると推定されたが(図7)、それに足りる1回投与量の抗体を準備するためにはヒ

ト抗体産生マウス 200 匹近くを免疫する必要があり、現実的な計画とは考えられず（図 8）、これを断念し、ヒト抗体産生ウシの免疫に注力することとした。

7. SARS 感染症ワクチン開発のための T 細胞エピートープの同定

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 細胞エピー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- 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。

8. 中国との研究調整

10 月 22 日に国際医療センターでの行われた中国医学科学院・中国協和医科大学の劉徳培院長との打

ち合わせ内容をまとめる。出席者は以下の通りである。

(中国側)

劉 徳培 (中国医学科学院・中国協和医科大学 院 校 長)

Zeper Abliz (中国医学科学院・中国協和医科大学、院 校 長 助 理、薬 物 研 究 所 研 究 員、国 家 薬 物・代 謝 産 物 分 析 セ ン ター 副 主 任)

胡 飛 躍 (中国 CDC 性 病・エイズ 予 防 コ ン ト ロール セ ン ター 助 教 授)

(日本側)

笹 月 健 彦 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 総 長)

近 藤 達 也 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 病 院 長)

桐 野 高 明 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 研 究 所 長)

工 藤 宏 一 郎 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 国 際 疾 病 セ ン ター 長)

岡 慎 一 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター エ イズ 治 療・研 究 開 発 セ ン ター 長)

畢 秀 瓊 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター エ イズ 治 療・研 究 開 発 セ ン ター リ サーチ レジデント)

野 田 光 彦 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 臨 床 検 査 部 長)

秋 山 徹 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 研 究 所 感 染 症 免 疫 遺 伝 研 究 室)

石 坂 幸 人 (国 立 国 際 医 療 セ ン ター 研 究 所 難 治 性 疾 患 研 究 部 部 長)

許 平 (日 中 産 学 官 交 流 機 構 医 学・ラ イ フ サ イ エ ン ス 部 会 ア ド バ イ サ ー)

柳 瀬 豊 昭 (日 中 産 学 官 交 流 機 構 事 務 局 長)

木 村 憲 (日 中 産 学 官 交 流 機 構 常 任 幹 事)

中国医学科学院の実験動物研究所は、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。打ち合わ

せではまず劉院校長より、協和医科大学の教育システムなどを中心とした、中国の医学研究体制の説明が行われた。続いて中国医学科学院の組織についての説明を受けた。中国医学科学院は、基礎研究所 9 施設、臨床研究所 6 施設、薬物探索研究所 3 施設を有し、それらは北京を中心に、中国国内 5 都市に位置している。また WHO 協力センターとしても機能しているとのことだった。その研究成果は SARS の動物モデル、中国人の心臓疾患リスク因子の解析、癌の遺伝子マーカーの同定、パーキンソン病の疫学解析、コレステロール低下薬物としてのベルベリンの作用、中国人の死亡原因の解析および新規薬物探索など、多岐に渡っており、すべて著名な学術雑誌に掲載されている。また日本学術振興会、熊本大学、東京大学、国立国際医療センターなど国内の機関、および米国研究機関と広く国際協力を進めているとの説明を受けた。これまでの協議や本会合のもと、平成 19 年 2 月に最終的な SARS-CoV 感染サルモデルで野生型ウシで作製した抗体の評価のための研究契約を締結し、本年度中に実験開始予定である。

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。同蛋白質をヒト型抗体産生マウスに投与して調整した IgG も顕著な *in vitro* 中和活性を示した。さらに予備試験として実施した野生型ウシの免疫実験でも準備した抗原で SARS-CoV 中和活性を持った IgG の誘導に成功してい

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 IgG も中和活性を示した。従って、ヒト抗体産生動物を用いて、SARS-CoV 中和活性を持ったヒト抗体を遺伝子改変動物を用いて作製するという当面の目標を達成できた。

3. 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常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、一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。

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、当面の目標だった SARS-CoV 中和活性を持ったヒト抗体創出に

成功した。またこの抗体大量調整のためのヒト抗体産生ウシを用いた免疫実験、その後の *in vivo* 評価のための中国でのサルモデル実験予試験の開始など、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: Hashimoto M, Furuyashiki M, Kaseya R, Fukada Y, Akimaru M, Aoyama K, Okuno T, Tamura T, Kirikae T, Kirikae F, Eiraku N, Morioka H, Fujimoto Y, Fukase K, Takashige K, Moriya Y, Kusumoto S, Suda Y. Evidence of immunostimulating lipoprotein co-existing in natural lipoteichoic acid fraction. *Infect Immun.* 2007 Feb 5
- 2: Zhao J, Hayashi T, Saarinen S, Papageorgiou AC, Kato H, Imanishi K, Kirikae T, Abe R, Uchiyama T, Miyoshi-Akiyama T. Cloning, expression and characterization of the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin-G from *Streptococcus dysgalactiae*. *Infect Immun.* 2007 Feb 5
- 3: Kawana A, Teruya K, Kirikae T, Sekiguchi J, Kato Y, Kuroda E, Horii K, Saito S, Ohara H, Kuratsuji T, Kimura S, Kudo K. "Syndromic Surveillance within a Hospital" for the Early Detection of a Nosocomial Outbreak of Acute Respiratory Infection. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Dec;59(6):377-9.
- 4: Sekiguchi JI, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Kasai A, Mizuguchi Y, Araake M, Fujino T, Kikuchi H, Sasaki S, Watari H, Kojima T, Miki H, Kanemitsu K, Kunishima H, Kikuchi Y, Kaku M, Yoshikura H, Kuratsuji T, Kirikae T. Outbreaks of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Community Hospitals in Japan. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov 22
- 5: Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, Kirikae T. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan;45(1):179-92.
- 6: Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Kiyohara A, Suda Y, Kirikae F, Kirikae T, Gotz F. Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5):3162-9.
- 7: Toyooka K, Liu F, Ishii M, Saito S, Kirikae T, Asano Y, Shinomiya H. Generation and characterization of monoclonal antibodies that specifically recognize p65/L-plastin isoform but not T-plastin isoform. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006 Jun;70(6):1402-7.
- 8: Miyoshi-Akiyama T, Ikebe T, Watanabe H, Uchiyama T, Kirikae T, Kawamura Y. Use of DNA arrays to identify a mutation in the negative regulator, *csrR*, responsible for the high virulence of a naturally occurring type M3 group A streptococcus clinical isolate. *J Infect Dis.* 2006 Jun 15;193(12):1677-84.
- 9: Papageorgiou AC, Saarinen S, Ramirez-Bartutis R, Kato H, Uchiyama T, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Expression, purification and crystallization of *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen. *Acta*

2006 Mar 1;62(Pt 3):242-4.

10: Sekiguchi J, Fujino T, Araake M, Toyota E, Kudo K, Saruta K, Yoshikura H, Kuratsuji T, Kirikae T. Emergence of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tuberculosis wards. *J Infect Chemother.* 2006 Feb;12(1):47-50.

11: Huang Q, Kirikae F, Kirikae T, Pepe A, Amin A, Respicio L, Slayden RA, Tonge PJ, Ojima I. Targeting FtsZ for antituberculosis drug discovery: noncytotoxic taxanes as novel antituberculosis agents. *J Med Chem.* 2006 Jan 26;49(2):463-6.

12: Obata S, Zwolska Z, Toyota E, Kudo K, Nakamura A, Sawai T, Kuratsuji T, Kirikae T. Association of *rpoB* mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*.

Int J Antimicrob Agents. 2006 Jan;27(1):32-9.

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. 三好(秋山) 徹、切替 照雄、石田 功. SARS コロナウイルス中和ヒト抗体開発の現状と将来. 22(12):1851-1857, 2006

2. 三好(秋山) 徹、切替 照雄、内山 竹彦. 劇症型溶連菌感染症の発症機序と治療. *小児科* 47(12):1863-1871, 2006

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表 (口頭・ポスター発表)

1. Miyoshi-Akiyama T, Zhao j, Uchiyama T, Kirikae T.: Correlation between Adhesion Ability to Mammalian Cells of Group A *Streptococcus* and their Virulence in a Mouse Model. 106th ASM General Meeting, Orlando FL, USA, June 21-25th, 2006.

2-2. 国内学会発表 (口頭・ポスター発表)

1. 森澤亜希、畠山精介、秋山 徹、切替照雄: SARS コロナウイルスと相互作用する宿主細胞内蛋白質の同定. 第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋

2. 畠山精介、秋山 徹、切替照雄: SARS CoV の Nucleocapsid と Membrane-protein の結合能と粒子形成能. 第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋

3. 福士雅也、秋山 徹、石坂幸人、切替照雄: SARS コロナウイルスの Spike タンパクは宿主細胞因子 Calnexin と結合する. 第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得)

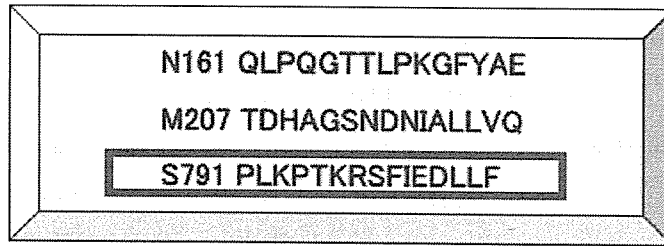
2. 実用新案登録

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.

Shicht:jc, 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

ペプチド本体(15mer)

2. MHC class II結合断片融合型

MHC classII結合断片

ペプチド本体

3. MAPペプチド型

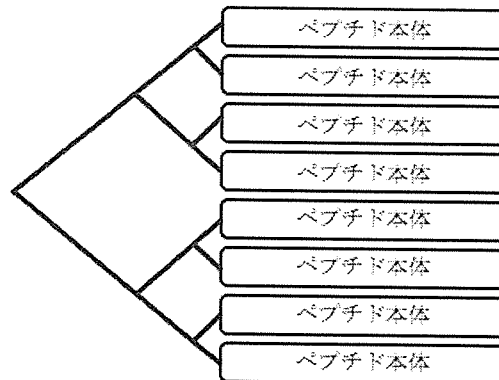


図 3

SARSコロナウイルス抗原の調製

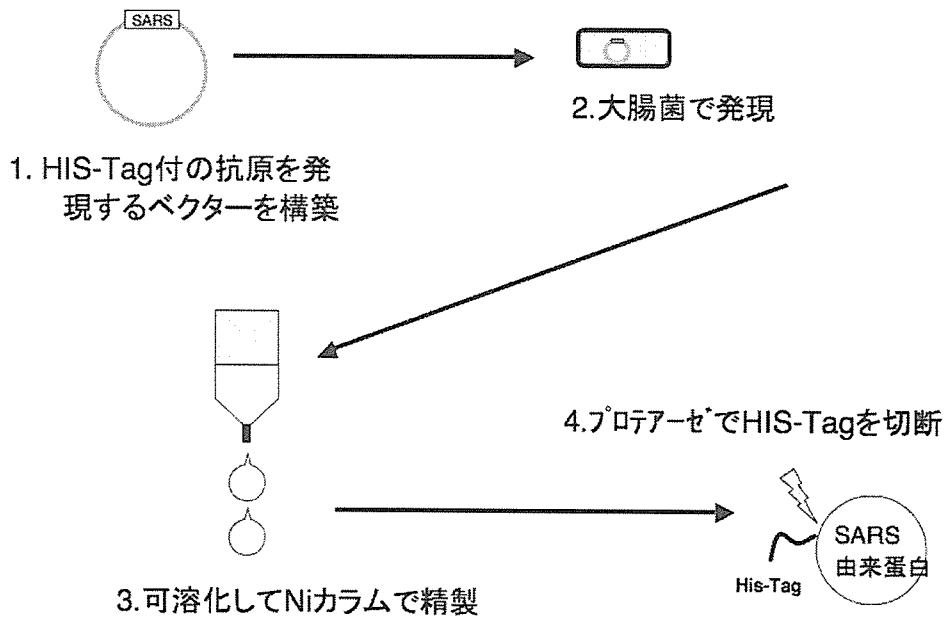
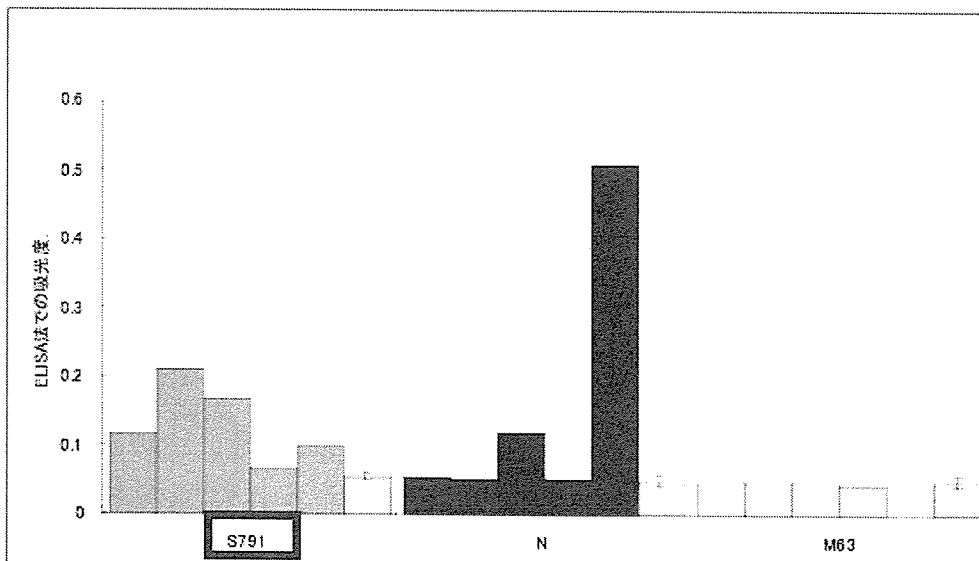


図 4

ヒト型マウス免疫



Freundのアジュバントで10回免疫後
(RIBIでは抗体価上昇を得られなかった)

図 5

SARSウイルス由来組換え蛋白に対する免疫反応(通常ウシ)

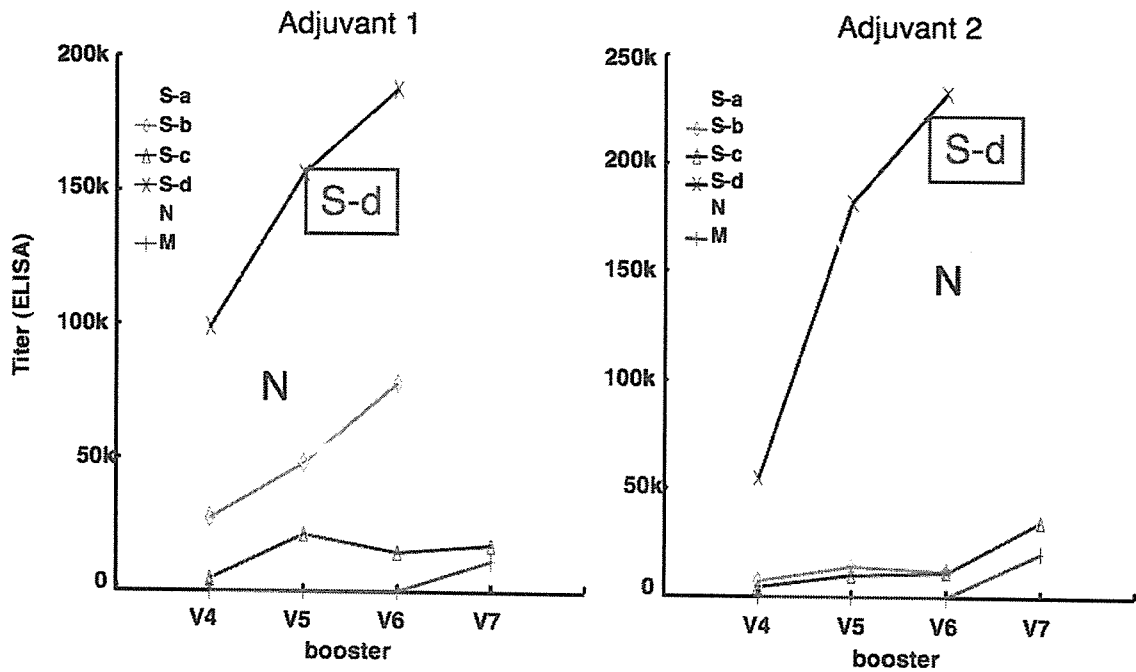
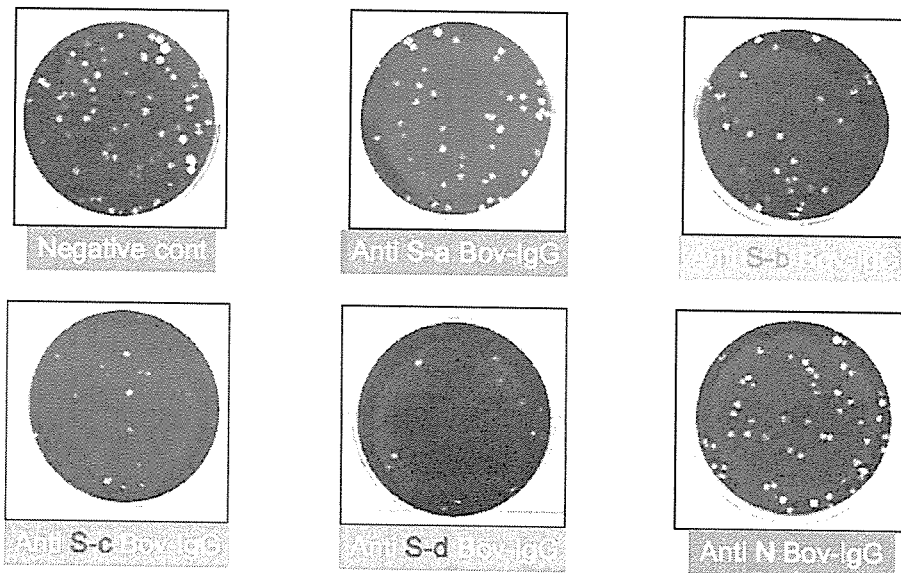


図 6

Vero細胞を用いたインビトロウイルス中和活性測定



抗S-c、S-dペプチドウシ抗体IgGは、ウイルス中和活性を示した。

図 7

抗体のSARSウイルス感染防御効果 に関する研究報告

Ab type	Titer (100% inhibition)		model animal	reference
	<i>in vitro</i> virus neutralization	<i>in vivo</i>		
serum from infected mice	1:284 1:1024	1:28 1:231	BALB/c	J. V. 78(7) 3572 (2004)
mAb (from human B cell)	1 to 850 ng/ml	200 μ g	mouse	Natru Med. 10(8) 871 (2004)
mAb (human scFV)	10 μ g/ml (effective to Tor2 and SZ3 but not to GD03T)	12.5mg/kg	BALB/c	J. V. 79(10) 5900 (2005)
mAb (from HuMab)	1.5 μ g/ml	40mg/kg	BALB/c	JID 191 507 (2005)

図 8

サル(Rhesus monkey)を使う場合のSARSウイルス感染防御に必要なIgG量の見積

- ・Rhesus monkey、3～5 kg(体重の重い方が、SARSの症状が重くなる傾向あり)
- ・血液総量: 210 to 350 ml (体重の7%として)
- ・ED50= ~10 μ g/mlの場合、ビボでは10倍濃度必要として計算すると
- ・1 shot当たり、21 to 35 mg のIgG が必要となる。

1 shotに200匹以上のマウスを必要するため、サルを使った実験は困難と判断した。

Ⅲ. 分担研究報告書

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。昨年度までに SARS-CoV ゲノムにコードされる蛋白質の組換え体を用いてヒト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。本年度は野生型ウシを用いた免疫実験を行った。組換え体のうちの一つはヒト抗体産生マウス、通常ウサギ、野生型ウシとも中和抗体を誘導可能だったが、別の一つは野生型ウシのみで中和抗体を誘導可能だった。得られた抗体のエピトープマッピングの結果から、前者の抗原では、複数のエピトープが相乗的に作用して中和活性を発揮しているのに対し、後者の抗原では特定のエピトープに対する抗体が中和活性に重要である可能性が示唆された。

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抗体産生動物の免疫を計画しており、昨年度までに抗原の調整のため、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、精製法の確立を行った。さらに得られた組み換え蛋白質を用いて、ヒト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。またヒト抗体産生ウシへの免疫実験の予備試験として、野生型ウシの免疫実験を昨年度中に開始した。

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：昨年度までに 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。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。
2. 野生型ウシ免疫実験：野生型ウシの免疫は 2 種類のアジュバントを比較しながら、抗原に応じて 6～9 回の抗原投与により行った。
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、これに反応するウシ抗体量を、抗ウシ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、精製 IgG 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。

5. IgG 標品のエピトープマッピング: ELISA プレートに Spike の各領域を網羅する 15mer のオーバーラッピングペプチドを固相化した。このプレートに各 IgG 標品を一定濃度となるように希釈後添加し、定法に従い、結合 IgG 量を比較した。対照として検体 IgG と同濃度に希釈した非免疫動物由来 IgG (ヒト抗体産生マウス由来 IgG についてはヒト IgG を使用) を使用し、データは対照 IgG の測定値をバックグラウンドとして差し引いた値で表した。

C. 研究結果

1. ウシの免疫実験: 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。免疫にはアジュバントシステムを 2 種類使用し、それぞれの抗原について、1 群 3 頭で実験を行った。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、平成 18 年 12 月までに最大 9 回の免疫を実施した。抗原により程度に差はあるが、各抗原ともある程度の抗体価上昇を認めた (詳細は石田の項を参照)。

2. 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ウシで作成した抗 SARS 因子の抗原ごとのプール IgG の中和活性を測定した。昨年度までに作製した通常ウサギ、ヒト抗体産生マウスの IgG との活性比較も実施した。spike 由来組換え蛋白質のうち、S-c と標記した断片ではウサギ、ヒト抗体産生マウス、さらに野生型ウシで中和活性を持った抗体を誘導可能だった。さらに野生型ウシのみで S-d と標記した断片でも中和

活性を持った抗体が誘導された (図 1)。

S-c および S-d に対する抗体の反応性の差異を検討するため、まずウシの S-c, S-d に対する抗体をプール IgG ではなく、個体ごとの IgG 標品で測定した。その結果、S-c に対する抗体については個体ごとの IgG 標品の測定では中和活性がほとんど検出できない個体が 4 頭中 2 頭存在し、S-d に対する抗体は検討した 4 頭中 3 頭の個体由来の IgG が中和活性を示すことが明らかとなった (図 2)。

次に、spike 蛋白質由来ペプチドを用いて、ウシ由来の IgG についてはプール分画および個体レベルの標品、ウサギ IgG、ヒト抗体産生マウス IgG のエピトープマッピングを行った。ウシの S-c に対する IgG は相対的に多様なエピトープと反応しており、個体レベルで中和活性を示した IgG と示さなかった IgG で、反応性に差異のあるエピトープを明確に特定することはできなかった。一方ウシの S-d に対する抗体はおおむね 5 か所のエピトープを中心とした特定のエピトープのみに反応性を示した (図 3)。

S-c に対するウサギの IgG、ヒト抗体産生マウス IgG はウシ IgG と同様多様なエピトープに反応性を示した。一方、S-d に対してはウサギ IgG は多様なエピトープと反応していたが、ヒト抗体産生マウスの IgG はウシ IgG と同様に限定的なエピトープのみと反応していた。さらにウサギ IgG やヒト抗体産生マウス IgG で反応性が低いにもかかわらずウシ IgG で反応性の高いエピトープが存在していることも明らかとなった。

D. 考察

準備した抗原のうち S-c によりヒト抗体産生マウスを免疫することで、ウイルス中和活性を持ったヒト抗体を作製できることが明らかとなった。エピトープマッピングの結果からは S-c の持つ多様なエピトープが相乗的に作用してウイルス中和活性を示している可能性が高い。一方、S-d を抗原とした場合

にはウシのみで中和活性を持つ抗体を誘導できたが、これは動物種による差異の可能性が考えられる。抗原とした Spike 由来のペプチドを用いたエピトープマッピングは抗体特性の評価系として有用であり、安定的な抗体医薬供給の基礎となるだろう。

E. 結論

以上から、本研究手法により抗 SARS-CoV 活性を持ったヒト抗体を作出可能であることが明らかとなった。平成 18 年 12 月よりヒト抗体産生ウシの免疫実験を開始しており、ヒト抗体大量調整が可能となると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 三好（秋山） 徹、切替 照雄、石田 功.
SARS コロナウイルス中和ヒト抗体開発の現状と将来.
化学療法の領域 22(12):1851-1857, 2006

学会発表

1. 森澤亜希、畠山精介、秋山 徹、切替照雄：
SARS コロナウイルスと相互作用する宿主細胞内蛋白質の同定. 第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋
2. 畠山精介、秋山 徹、切替照雄：SARS CoV の Nucleocapsid と Membrane-protein の結合能と粒子形成能. 第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋
3. 福士雅也、秋山 徹、石坂幸人、切替照雄：
SARS コロナウイルスの Spike タンパクは宿主細胞因子 Calnexin と結合する. 第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

図 1

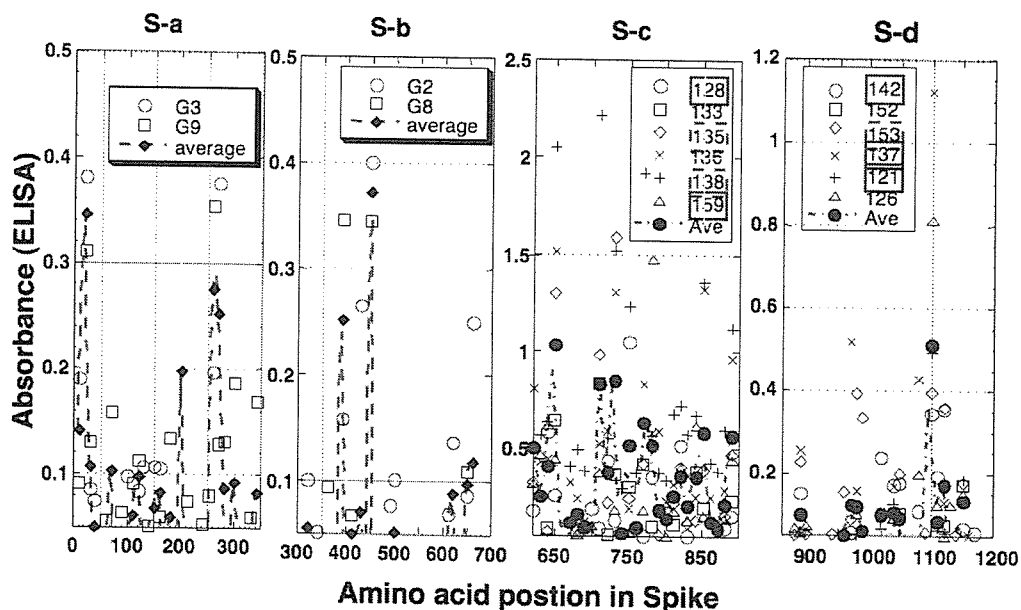
in vitro SARS-CoV neutralizing activity of the antibody preparations

	rabbit	KM mouse	cattle
S-a	NO	NO (at low conc.)	NO
S-b	NO	NO (at low conc.)	NO
S-c	YES	YES	YES
S-d	NO	NO	YES
N	NO	NO	NO

(東京医科歯科大学山本教授、吉仲助教授の指導で実施)

図 2

Epitope mapping of the antibodies produced in wild type cattle



(S-cとS-dのデータではシンボル内の数字はウシ個体を表し、実験で開った個体のIgGはウイルス中和活性が陽性、点線のそれは陰性だった。)

Comparison of the epitope among the Abs from WT cattle,
rabbit and KM mouse

