

研究要旨

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

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。

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

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

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

B. 研究方法

一昨年度 7 月に中国・北京にて開催された「新興再興感染症制圧のための共同戦略会議（北京）」に笹月等が出席し、中国に滞在して、中国医学科学院（CAMS）実験動物研究所、中国科学院生物物理研究所、清華大学理学部及び中国医学科学院中国协和医科大学の研究者と共同研究の可能性を話し合った。これらの研究者とは平成 17 年 3 月 10～11 日「新興・再興感染症シンポジウム（東京）」の際も共同研究に関する話し合いを行った。また平成 18 年 10 月 22 日には国際医療センターにて、中国医学科学院・中国協和医科大学の劉徳培院校長と本プロジェクトの進行状況などを含めた包括的な討論・打ち合わせを実施した。

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

してきた。

C. 研究結果

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校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)

Z eper A bliz (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ザー)

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。

D. 考察

中国医学科学院実験動物研究所は、中国政府が認定した感染実験を実施するために、北京市に設立された、非常に安全な施設であり、昨年度来の打ち合わせ・交流を通じて、中国医学科学院実験動物研究所共同研究においてSARSサル感染実験実施のための研究契約を締結でき、研究推進のため良好な協力体制を築くことができた。本年度末には実験開始を予定している。

E. 結論

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

することができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 原著論文

1: Han JF, Jiang T, Chen SP, Yu M, Qin ED, Zhao Z, Li XF, Qin CF, Deng YQ, Zhao H, Zha HL, Li XY. Construction of genomic full-length cDNA of SARS coronavirus BJ01 strain and identification of its biological characteristics Wei Sheng Wu Xue Bao. 2006 Dec;46(6):922-7.

2: Wu M, Qin C, Foreman RD, Farber JP. Transient receptor potential vanilloid

receptor-1 does not contribute to slowly adapting airway receptor activation by inhaled ammonia.

Auton Neurosci. 2006 Dec 11

3: Shi SQ, Peng JP, Li YC, Qin C, Liang GD, Xu L, Yang Y, Wang JL, Sun QH. The expression of membrane protein augments the specific responses induced by SARS-CoV nucleocapsid DNA immunization. Mol Immunol. 2006 Apr;43(11):1791-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況：無し

分担研究報告書

ウイルス中和活性の測定

分担研究者 田代 真人 国立感染症研究所部長

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。ヒト抗体産生マウス、通常ウサギ、野生型ウシとも、一部の抗原ではヒト抗体産生マウスから調整した IgG を含め、*in vitro* SARS-CoV 中和試験で十分な中和活性を得ることが出来た。

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命率が約 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。昨年度までに、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、さらに 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への改良を行った。これらの試験の過程で、検体として使用する血清が由来動物種によっては、非特異的なウイルス感染阻害作用を示すことが明らかとなったので、本年度からはさらに Protein G カラムを用いて IgG 画分を精製し、試験に供するとした。

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) 抗血清から精製した IgG 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°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°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。

図 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 IgG 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）。一方、通常ウサギ、通常マウスおよびヒト抗体産生マウスに Spike 蛋白質断片を免疫して得られた IgG はウイルス中和活性を示した。

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。当初報告した 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、さらに検体から IgG を精製することで血清成分に存在する非特異的抑制因子の効果を排除できるようになった。

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も中和活性が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1: 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. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine. 2007 Jan 23

2: 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 Dec;78(12):1509-12.

3: 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.

4: 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.

5: 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-

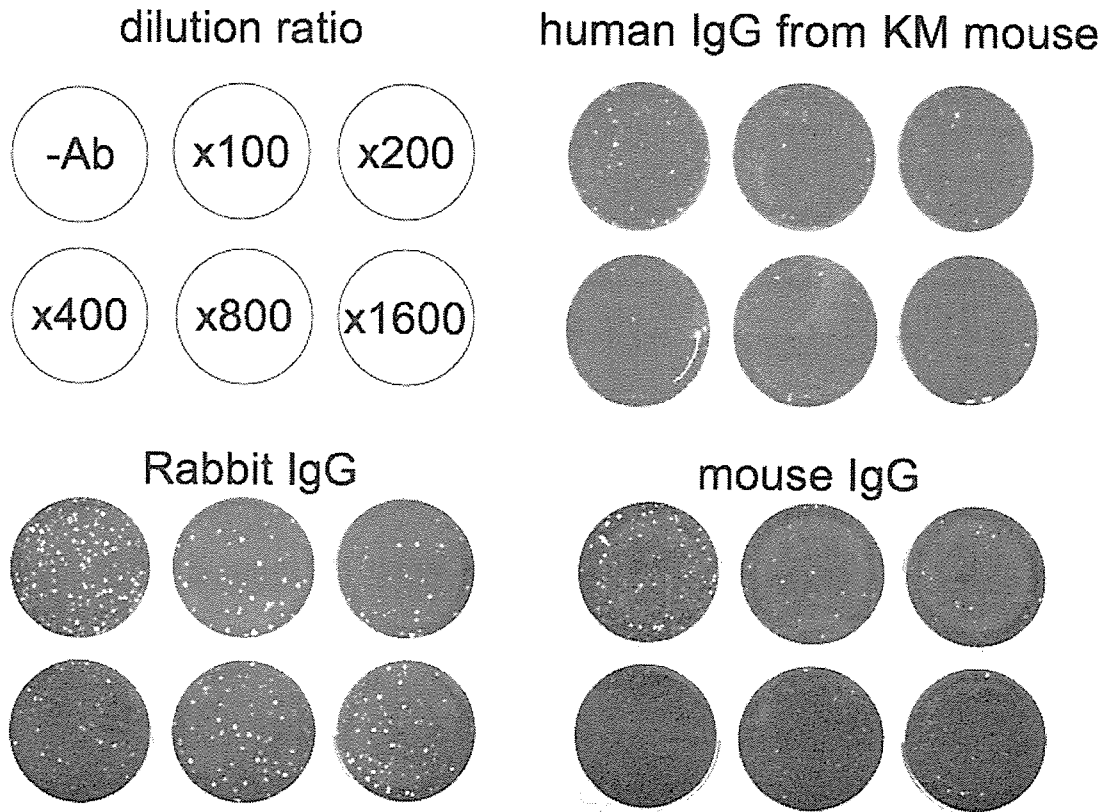
associated coronavirus infections in experimental animals. *Adv Exp Med Biol.* 2006;581:515-8.

6: 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.

7: 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 Aug 1;351(2):368-80.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

in vitro SARS-CoV neutralization by the IgG preparations



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。これらの知見を元にデザインした抗原を利用し SARS 感染者の迅速診断キットの試作品を開発した。

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り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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1-1. 論文発表 1: Tanaka M, Komatsu N, Yanagimoto Y, Oka M, Shichijo S, Okuda S, Itoh K. Development of a New Diagnostic Tool for Pancreatic Cancer: Simultaneous Measurement of Antibodies against Peptides Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. Kurume Med J. 2007;53(3-4):63-70.
- 2: Komohara Y, Yano H, Shichijo S, Shimotohno K, Itoh K, Yamada A. High expression of APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. J Mol Histol. 2006 Nov;37(8-9):327-32.
- 3: Homma S, Harada M, Yano H, Ogasawara S, Shichijo S, Matsueda S, Komatsu N, Shomura H, Maeda Y, Sato Y, Todo S, Itoh K.

Identification of squamous cell carcinoma antigen-derived peptides having the capacity of inducing cancer-reactive CTLs in HLA-A24+ cancer patients.
Int J Oncol. 2006 Sep;29(3):577-87.

- J. 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

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。昨年度までに 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、そ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。本年度は野生型ウシを用いた免疫実験を行い、得られた抗体の評価を行った。ヒト抗体産生マウス、通常ウサギ、野生型ウシとも投与抗原を使用した ELISA による抗体価評価で十分な力価を得ることができ、一部の抗原ではヒト抗体産生マウスから調整した IgG を含め、*in vitro* SARS-CoV 中和試験で十分な中和活性を得ることが出来た。

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、一旦患者が発生すると、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、ヒト抗体産生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の作出についてもさらに検討を進めた。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抗体のみを産生するマウスである。一方、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抗体産生ウシの開発を行っている（巻末参考資料を参照）。本計画ではこれらのヒト抗体産生動物を利用して SARS-CoV 中和ヒト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

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。

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。

C. 研究結果

1. ウシの免疫実験：一準備した 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。アジュバントシステムを 2 種類使用し、それぞれの免疫効率に差異があるかどうかを検討した。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、平成 18 年 12 月までに最大 9 回の免疫を実施した (図 1)。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。

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 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。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。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 2, 3)。

本計画とは独立して、キリンはウシで抗体を生産する際の BSE 問題に対応するため、ウシプリオンノックアウトウシを作出した。プリオンノックアウトウシを正常に成長しており、将来ヒト抗体をウシで生産する際に利用可能と考えられる (図 4)。

D. 考察

準備した抗原で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。また野生型ウシでも準備した抗原でウイルス中和活性を持った抗体を調整できた。

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. Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM, Kuroiwa Y. Production of cattle lacking prion protein. Nat Biotechnol. 2007 Jan;25(1):132-8.
2. 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.

化学療法領域 22(12):1851-1857, 2006

学会発表

1. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

図 1

SARSウイルス由来組換え蛋白に対する免疫反応(通常ウシ)

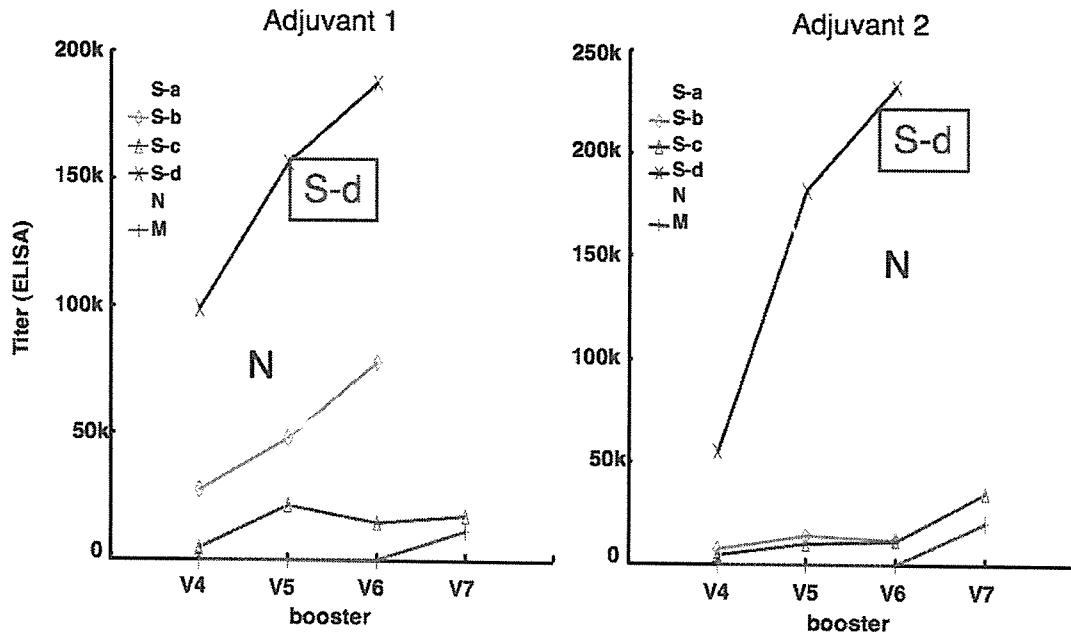
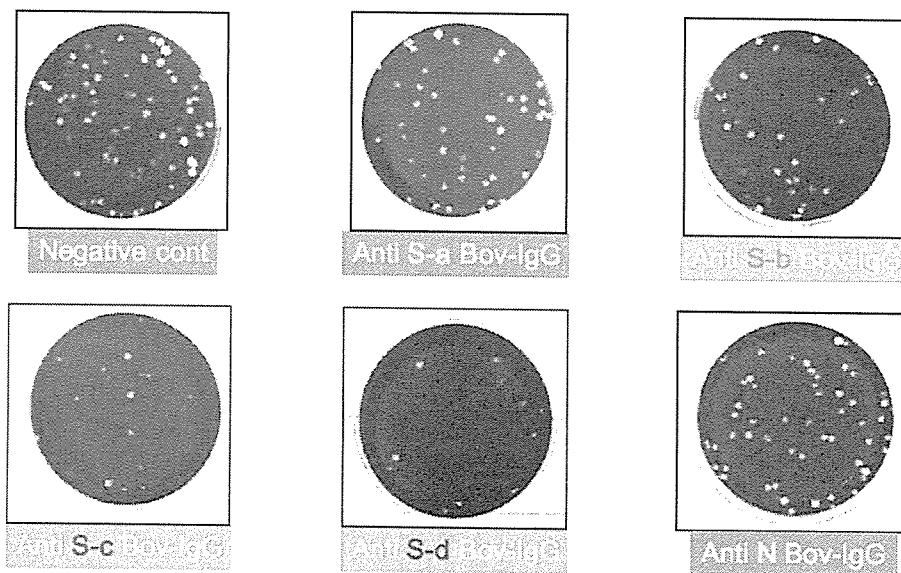


図 2

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 3

SARSウイルス中和活性測定(ED50)

	rabbit	KM mouse	C57BL/6	cattle
S-a	NO	NO (at low conc.)	-	NO
S-b	NO	NO (at low conc.)	-	NO
S-c	8.6 $\mu\text{g/ml}$	6.1 $\mu\text{g/ml}$	31 $\mu\text{g/ml}$	27 $\mu\text{g/ml}$
S-d	NO	NO	-	35 $\mu\text{g/ml}$
N	NO	NO	-	NO

図 4



KOウシ342 (Prion-/-、左)と341 (Prion-/+、右)、約1ヶ月齢

- ・現在では生後1年以上経過している。
- ・インビトロT細胞反応、抗体反応正常。
- ・精子、卵正常。
- ・脳組織化学正常。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	59(6)	377-379	2006
Kawana A, Teruya K, Hama T, Kuroda E, Sekiguchi J, Kirikae T, Naka G, Kimura S, Kuratsuji T, Ohara H, Kudo K	Trial surveillance of cases with acute respiratory symptoms at IMCJ Hospital.	Jpn J Infect Dis.	58(4)	241-243	2005
Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phi NC, Van Ban V, Ha LE, Long HT, Yanai H, Keicho N, Kirikae T, Sasazuki T, Anderson RM.	Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam.	Am J Trop Med Hyg.	73(1)	17-25.	2005
Itoyama S, Keicho N, Hijikata M, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha le D, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T.	Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population.	Am J Med Genet A.	136(1)	52-57	2005
Hamano E, Hijikata M, Itoyama S, Quy T, Phi NC, Long HT, Ha le D, Ban VV, Matsushita I, Yanai H, Kirikae F, Kirikae T, Kuratsuji T, Sasazuki T, Keicho N.	Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population.	Biochem Biophys Res Commun.	329(4)	1234-1239	2005
倉辻忠俊, 切替照雄	. 【広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査 その数値をどう読むか】 免疫学的検査ウイルス感染症関連検査(抗原および抗体を含む) SARS コロナウイルス	日本臨床	63 巻増刊 7号	343-345	2005
切替照雄	SARSのウイルス学	医療	58 巻 3号	138-142	2004
切替照雄	SARS最新情報 検査法の現状と今後の展望	化学療法の領域	20 巻 1号	63-69	2003

5. SARS コロナウイルス中和ヒト抗体開発の現状と将来

三好(秋山) 徹*¹⁾ 切替 照雄*²⁾ 石田 功**

2002年～2003年に猛威をふるった重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因病原体はSARSコロナウイルスであるが、その治療法・予防法はまだ確立されていない。筆者らはその感染制御のため同ウイルス中和活性を持ったヒトポリクローナル抗体をヒト抗体産生動物を用いて作成することを試みている。すでに遺伝子組み換え動物でヒト抗体を産生させることに成功している。SARS患者回復期血清を用いた解析をもとに特定した抗体作成の標的となるSARSウイルス抗原を大腸菌にて組み換え蛋白質として発現させ、それらを動物に投与して得られた抗体のウイルス中和活性を検証中である。本研究は新興感染症対策の新規アプローチのプロトタイプとなると期待される。

Key Words : ヒト抗体産生動物/重症急性呼吸器症候群/中和抗体/SARS コロナウイルス

I はじめに

2002年11月に中国広東省仏山で第1症例が確認されて以降、グローバリゼーションを象徴するかのように重症急性呼吸器症候群(SARS)は瞬く間に全世界に広まり、2003年7月まで猛威をふるい、8,098名が発症し、その約10%にあたる774名が死亡した。その間、感染制御の歴史上初めてと考えられる世界各国の連携による封じ込めが奏功し、SARS流行は2003年中には終息を迎えた。その後、2004年にごく少数の症例が報告されて以降は、SARSの発生は報告されていない。2003年の大流行の社会的および経済的影響は甚大であり、改めて感染症の脅威を認識することとなった。

SARSは2003年中にその原因病原体であるSARSコロナウイルス(CoV)が同定され、さら

に同ウイルスの宿主受容体がアンギオテンシン転換酵素II(ACE2)であることが明らかにされるなど、新興感染症としてはまれに見る速さでその基礎的研究が進んだ。SARS-CoVと類似性の高いウイルスはハクビシンおよびコウモリからの分離例がある。しかしながら依然としてSARS-CoVそのものの自然宿主は同定されていないと考えられており、人類はSARS再流行の可能性にさらされている。それにも関わらず、SARSの予防法および治療法は未だ確立されていない。それら確立の試みの一環として筆者らはSARS-CoV中和活性を持ったヒト抗体によるSARSの克服を目指した免疫療法の開発を行っている。

本稿ではその意義、開発状況などについて述べ、またSARS-CoV感染症の治療薬や免疫療法の現状について概説する。

Human antibodies neutralizing SARS coronavirus : Development and the future

* Tohru Miyoshi-Akiyama, Teruo Kirikae 国立国際医療センター(研究所)感染症制御研究部 研究室長 部長

** Isao Ishida キリンビール株式会社医薬カンパニー 所長

(1851) 47

II SARS-CoV に対するポリクローナルヒト中和抗体開発の意義

ウイルス感染症対策の重要な柱はワクチン接種である。しかしながらワクチン接種は不特定多数の人々に実施される必要がある。医薬品を用いたウイルス感染症への対応は、患者を直接治療できるという点でワクチン接種とは異なる利点を持っている。ウイルス感染症ではウイルス本体の感染性抑制(中和)には液性免疫、すなわち抗体が重要な役割を果たし、感染細胞の除去には細胞性免疫が重要な役割を果たすことは良く知られており、これらの防御機構を利用できればウイルス感染症を制御できると期待される。興味深いことに SARS-CoV のマウス感染モデルで、その感染防御には T 細胞ではなく液性免疫が重要な役割を果たしていることが報告されている¹⁾。このことは抗体医薬が SARS-CoV 感染症治療に応用できる可能性を示唆するものである。ウイルスや細菌などの感染症への応用として抗体医薬を考えた場合、単一エピトープを認識するモノクローナル抗体の治療効果は抗原性の変化などの要因と相まって限定的であることが多い。ここにポリクローナル中和抗体開発の意義があると考えられる。このようなポリクローナル抗体を利用した感染症治療の考え方は、1890年に北里柴三郎が行った破傷風毒素に対する血清療法に遡るものである。

本計画のもう一つの意義は開発される抗体がヒト抗体だということである。異種抗体を用いた抗体療法は投与抗体に対する抗体の出現およびアナフィラキシーの発生の問題を常に内包している。一方、ヒト抗体のウイルス感染症適用例と考えられるヒト免疫グロブリン製剤では、供給量の限界、低力価、高価、そして新興感染症には無力、という難点がある。そこで筆者らはヒト抗体産生動物を SARS-CoV 由来抗原で免疫することで、高力価の SARS-CoV 中和活性を持ったヒトポリクローナル抗体を得るという研究を開始した。

III ヒト抗体産生動物の開発

すでに抗体医薬は癌治療や臓器移植の現場で使用されはじめているが、それらの多くがマウスな

ど異種動物に由来するモノクローナル抗体であった。そのため人体への抗原性を低下させるそれら抗体のヒト化の問題が、抗体医薬の臨床応用までの大きな課題となっていた²⁾。筆者らは完全なヒトモノクローナル抗体取得のため、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの開発に取り組んだ。ヒト抗体産生マウスの開発競争の中でブレイクスルーとなったのが、通常の遺伝子組み換えベクターでは導入が困難な、1Mb を超える巨大なヒト免疫グロブリン遺伝子全長をマウスへ導入するためのトランスクロモソーム (TC) 技術である³⁾。これはヒト染色体そのものをマウスへの遺伝子導入ベクターとして利用するものであり、TC 技術により導入されたヒト染色体由来自然断片はマウス体細胞において正常な組織特異性で発現をし、安定に維持される。この技術を用いてヒト免疫グロブリン重鎖全長および軽鎖 (κ) を導入し、さらにマウスの重鎖と軽鎖 (κ) をロックアウトしたダブル TC/KO のヒト抗体産生マウス (TC マウス) の作出に成功した (図 1)。TC マウスはヒトで観察されるのと良く一致する IgG サブタイプの濃度比を持ち、またヒト抗原で免疫すると特異的なヒト IgG 力価上昇が観察され、抗原特異的なヒト IgG 抗体産生性のハイブリドーマを樹立することも可能だった。現在では、米国 Medarex 社との提携で、同社が作成した Hu-Mab マウスと TC マウスの交配により IgG 抗体産生性ハイブリドーマの樹立効率などが向上した改良型ヒト抗体産生マウスである KM マウスやその改良型マウスが利用可能となっている⁴⁾。

マウスによるヒト抗体産生ではポリクローナル抗体として得られるヒト抗体量には限界がある。そこでより大型の動物によるヒト抗体産生の可能性を検討した結果、TC 技術と体細胞クローン技術を組み合わせてヒト抗体を発現するウシを誕生させることに成功している⁵⁾。この技術はヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の全領域を含むヒト人工染色体 (HAC) ベクターをウシの初代胎児線維芽細胞にマイクロセルを利用して染色体移植を行うものであり、染色体導入が確認された細胞をクローンウシ胎児まで成長させた後、同胎児より線維芽細胞を樹立して TC ウシを作出する (図

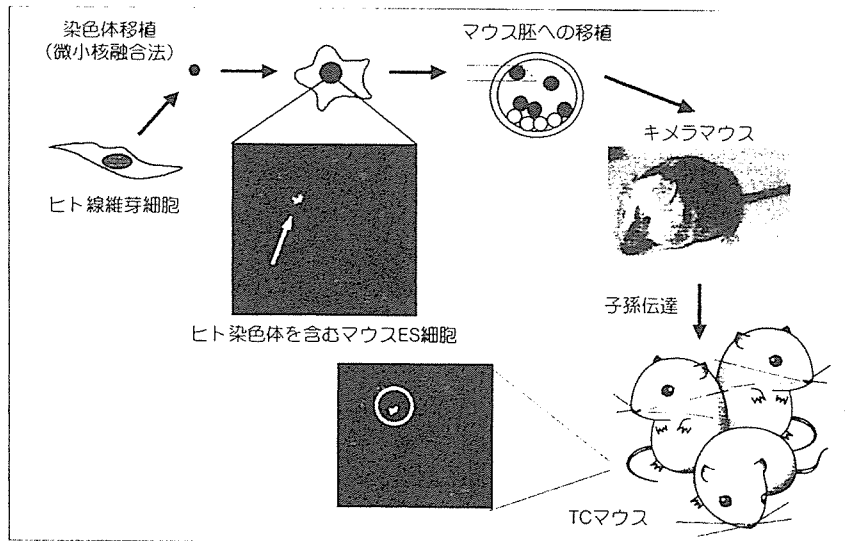


図1 TCマウス作製法

ヒト-マウスハイブリッド細胞を紡錘系形成阻害剤であるコルセミド処理することで、1～数本の染色体が核膜に包まれた構造体であるマイクロセルが形成される。サイトカラシンB存在下で遠心分離精製したマイクロセルをマウスES細胞と融合させる。

(文献3より改変)

2)。このウシでの HAC 保持効率は 78 ～ 100% と高率で、ヒト免疫グロブリン座位は再配置を起こす能力を保持して、免疫グロブリンとしての多様性を保持した mRNA が産生されていた。またこのウシではヒト免疫グロブリン蛋白質が血中に産生されていた。実用レベルのヒト抗体生産にはさらなる改良が必要であるが、ウシから低コストで様々な病原体に対する高力価ヒトポリクローナル抗体を得られる日が近い将来訪れるに違いない。

IV ヒト抗体作成のための SARS-CoV 抗原の選定

SARS-CoV 中和ヒト抗体作成用の同ウイルス由来抗原の選定を行うため、筆者らは SARS 患者回復期血清中に存在する SARS-CoV 反応性抗体のエピトープ解析を行った⁶⁾。SARS-CoV はエンペロープウイルスであり、その主要蛋白質として spike, membrane, nucleocapsid および envelope がある。そこでこれら蛋白質のアミノ酸配列をもとに各蛋白質の全領域をカバーするペプチドライブラリを作成した。このライブラリは総計

197 種類の 15mer からなるペプチドから構成され、各ペプチドは 5 アミノ酸ずつ隣のペプチドとオーバーラップしている。これら多数のペプチドへの患者血清反応性を効率良く解析するため Luminex と呼ばれるフローメトリー技術を利用した。この技術は蛍光波長の異なるビーズから構成されるカラーコード化されたマトリックスを利用して、各ビーズに異なるペプチドを固定し、患者血清の各ペプチドへの反応性を短時間で行うものである (図3)。この手法を用いて、まず 3 名の SARS 患者の血清および陰性コントロールとしての 3 名の健常者の血清の各ペプチドへの反応性を比較し、SARS 患者に特異的に反応する 42 種類のペプチドを選別した。

次にこれら 42 種類のペプチドについて、ベトナムの SARS 患者血清の解析を行った。ベトナムは WHO や本邦の技術協力を早期に受け入れ、世界で最初に SARS 封じ込めに成功した国である⁷⁾。SARS 制圧後も、ベトナムと我が国との共同研究で、SARS に感染しながらも死亡を免れたベトナム人のほとんど (45 名) から回復期血清の提供を受けることができた。ベトナム SARS 患者

(1353) 49