

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

I. 総合研究報告書

総合研究報告書

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 ウイルス中和ヒト型抗体の開発を行うことである。本研究では 1) 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 種類のエピトープの同定、2) 同定されたエピトープを元にしヒト抗体産生動物免疫用の抗原としての、ペプチド、組換え蛋白質などの設計・作成、3) 抗原の通常ウサギ、ヒト型抗体産生マウス、および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、4) 得られた IgG の *in vitro* SARS-CoV 中和試験を実施し、5) ヒト型抗体産生ウシの免疫実験を開始した。6) ま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着手した。さらに 7) 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。本研究の結果、準備した SARS-CoV 由来抗原により SARS-CoV 中和活性を持ったヒト抗体をヒト抗体産生動物で作製することが可能となった。

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型中和抗体の開発を目指す。

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 蛋白質および membrane 蛋白質、そして抗原性が高いと推定される nucleocapsid 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ようなペプチドを合成し、SARS 患者血清と反応する多数の抗原エピトープを同定する。これらエピトープを含むオリゴペプチドをヒト抗体産生マウスに免疫し、さらにヒト抗体産生マウスウシに免役して、それらに対する多数のヒト型モノクローナル抗体を作成し、SARS ウイルス中和抗体を有する抗体を同定する。

これらの中から、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。このようにして決定した SARS ウイルス抗原を、ヒト抗体産生ウシに免疫することにより大量のヒト型中和抗体を作成し実用化を目指す。

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

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488.2) からウイルス構成タンパク (spike(S), nucleocapsid(N), membrane(M), and envelop(E)) 由来の 15mer ペプチドをそれぞれ 125、43、22、7 種類 (合計 197 種類)、純度 70 %以上で合成した。スクリーニングの結果得られたペプチドに関しては、純度 90 %以上で再合成し、抗体の反応性、特異性などの確認を行った。各ペプチドは dimethylsulfoxide(DMSO)に 10mg/ml の濃度で溶かし、-20°Cで保存した。

100 μ l の color-coded beads を 100 μ l のペプチド (1mg/ml in morpholinoethanesulfonic acid (MES) buffer、pH4.5) と混ぜ、これを 1mg/ml の 1-ethyl-3-[3-dimethylamino propyl]carbodiimide-2(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (EDC) と室温暗所で 30 分間静置した後、Tween-20 phosphate buffered saline (T-PBS) で洗浄した。ビーズを 2-aminoethanol と室温暗所で 10 分間処理した後、2 回洗浄し、1ml の 0.05 % Block Ace in T-PBS に懸濁した。

各種ペプチドに対する抗体は、Luminex を用いた flowmetry で行った。即ち、100 から 10000 倍に希釈した血清(または血漿) 2 μ l を、ペプチドを結合さ

せた color-coded beads 25 μ l と室温、2 時間 96 穴フィルタープレート上でインキュベートした。その後、ビーズを洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG と室温で 1 時間反応させた。更に、洗浄後、100 μ l streptoavidin-PE と室温で 30 分間反応させた後 3 回洗浄し、100 μ l の T-PBS に再懸濁した後、Luminex で測定した。

実験操作は全て、国立国際医療センター研究所内の高度安全管理室 (P3 相当) 内で行った。N95 以上の性能のある感染防御マスク、使い捨てガウン、使い捨てエプロン、使い捨て手袋(二重)、汚染除去可能な履物(ゴム長靴)、ゴーグル、必要に応じて顔面カバー等を使用して実験を行った。実験使用後は、次亜塩素酸処理後、オートクレーブ処理して廃棄した。

以上により選定した 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) 修飾したものも合成した。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. 準備した抗原による動物の免疫

ヒト抗体産生動物として KM マウスおよび TC ウシを使用する計画とした。その他、抗原投与について知見が蓄積されている通常ウサギや通常マウス、さらに TC ウシの予備試験用に野生型ウシの免疫実験も実施した。免疫には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などの動物への侵襲性が低いアジュバントシステムを中心に、抗体価上昇が得られにくい場合には、Freund のアジュバントシステムも使用した。

4. 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。この作用の観察では、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。さらに、SARS 関連のコロナウイルスの CPE の出現は接種検体にもよるが比較的早い(3~6日目)と報告されている。この系は、SARS 患者の血清診断にも応用されており、本研究では、この系をヒト型抗体の中和試験に対して最適化を行い、測定系を確立を行った。

5. 中国との研究調整

筐月は、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い、また切替や石田功を中国に派遣して、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。必要に応じて中国側共同研究者と日本でも会合を実施し、意見交流を行った。

(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って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

昨年度中に、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(図4)。

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：マウスの免疫は最大6回実

施した。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、Sの断片の一つ、Nは特に良好な免疫原性を持つことが明らかとなった。その他のSの断片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。この結果を元に、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(結果は示さない)。

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)。また

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。当初は血清を希釈し、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。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（図 6、9）。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pite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pite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

笹月氏は「新興再興感染症制圧のための共同戦略会議（北京）」出席のため、平成 16 年 7 月 18～20 日、中国に滞在し、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。さらに平成 18 年 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打ち合わせを実施した。

これらの打ち合わせ・交流を元に平成 17 年 3 月 21～24 日には切替、石田など 5 名を中国医学科学院（CAMS）実験動物研究所、中国科学院生物物理研究所、清華大学理学部生物学教室及び中国医学科学院中国协和医科大学に、平成 18 年 3 月 9～11 日には 4 名を中国医学科学院に、平成 19 年 2 月 1～3 日には 3 名を中国医学科学院に派遣し、中国での SARS 感染サルモデルを用いた中和抗体の評価実験の研究契約を締結した。すでに評価用抗体は中国に到着しており、本年度末までに実験を開始する。

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、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。これらの知見を元に中和抗体を誘導可能だった抗原を用いて、ヒト抗体産生ウシの免疫実験を開始しており、中和抗体の大量生産への目処をつけることができた。

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康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、研究開始以来の打ち合わせ・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、3 年間の研究で当面の目標だった 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 Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 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.
- 12: 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.* 2005 Aug;58(4):241-3.
- 13: 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.* 2005 Jul;73(1):17-25.

14: 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.* 2005 136(1):52-7.

15: 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.* 2005 329(4):1234-9.

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*
3. 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(解説). *日本臨床 (0047-1852)63 巻増刊 7号 Page343-345*

4. 切替照雄. 【エビデンスに基づいた ICT のための感染対策トレーニングブック】 感染対策の最新情報をチェックしよう! 病院感染対策関連法規(解説/特集). *INFECTION CONTROL. 2005 年秋季増刊号 Page244-251(2005)1-4.*

5. 切替照雄. SARS のウイルス学. *医療 58 巻 3号 (2004) 138-142*

6. 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. (2003) 20 巻 1号 63-69*

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
4. 濱野栄美, 土方美奈子, QuyTran, PhiNguyen Chi, LongHoang Thuy, HaLe Dang, BanVo Van, 糸山

智, 松下育美, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)と抗ウイルス蛋白 MxA, OAS1 遺伝子多型の関連解析. 日本臨床分子医学会 42 回学術総会プログラム・抄録集 Page119(2005. 07)

5: 濱野栄美, 土方美奈子, QuyTran, PhiNguyen Chi, LongHoang Thuy, HaLe Dang, BanVo Van, 糸山智, 松下育美, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人. 重症急性呼吸器症候群(SARS)と抗ウイルス蛋白 MxA, OAS1 遺伝子多型の関連解析. 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)43 巻増刊号 Page250(2005. 04)

6: 糸山智, TranQuy, NguyenPhi Chi, HoangLong T., LeHa D., VoBan Van, 土方美奈子, 松下育美, 大橋順, 川名明彦, 野内英樹, 切替照雄, 倉辻忠俊, 笹月健彦, 慶長直人. 呼吸器疾患と遺伝子多型 Angiotensin converting enzyme 1(ACE 1)の遺伝的多型と Severe acute respiratory syndrome (SARS)の重症化. 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)43 巻増刊号 Page54(2005. 04)

7: 濱敏弘, 川名明彦, 照屋勝治, 國方徹也, 枝元良広, 佐藤守仁, 黒田恵美, 堀井久美, 小野瀬友子, 吉田メイ子, 此崎寿美, 永野哲史, 関口純一朗, 切替照雄. 急性呼吸器症状サーベイランスの試み. 環境感染(0918-3337)20 巻 Suppl. 号 Page139(2005. 02)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得)

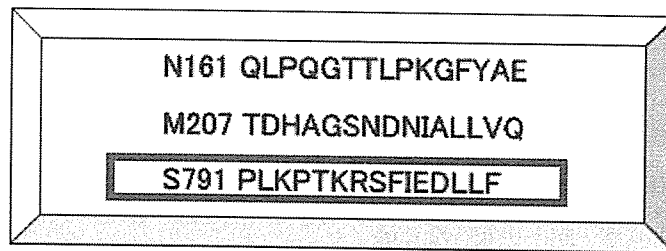
2. 実用新案登録

特になし

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.

Shichijo, 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

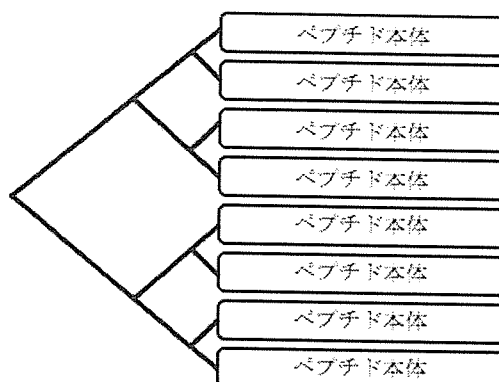


図 3

SARSコロナウイルス抗原の調製

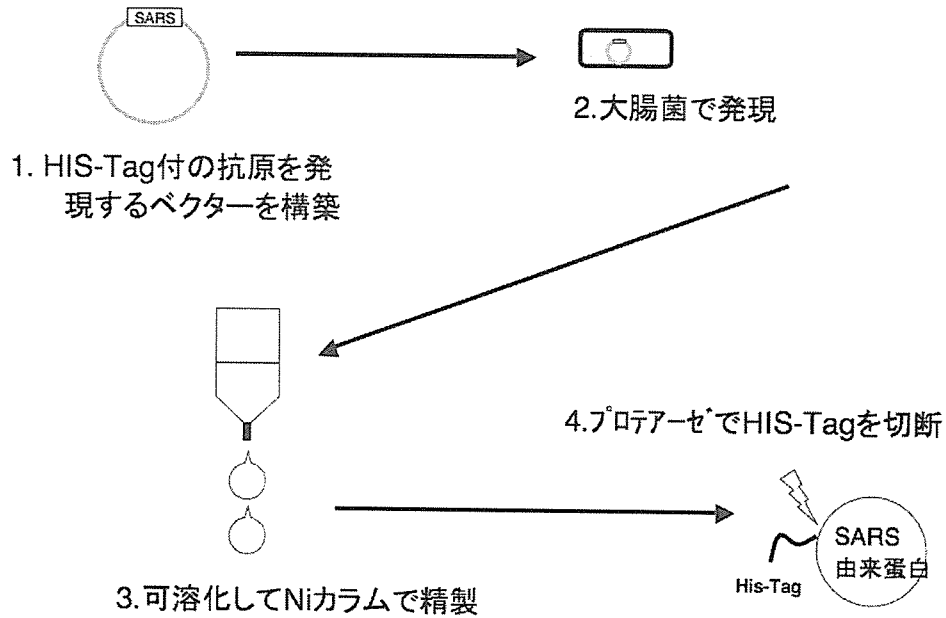
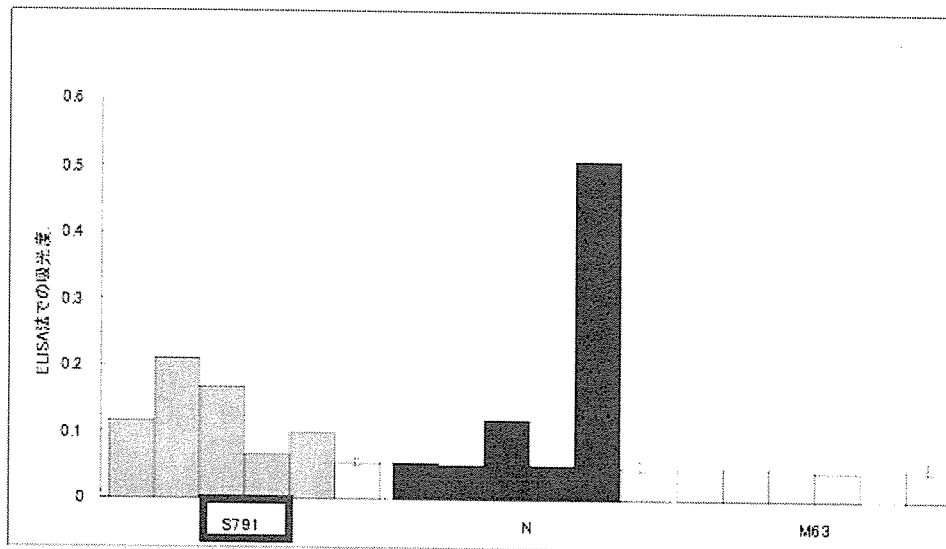


図 4

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)

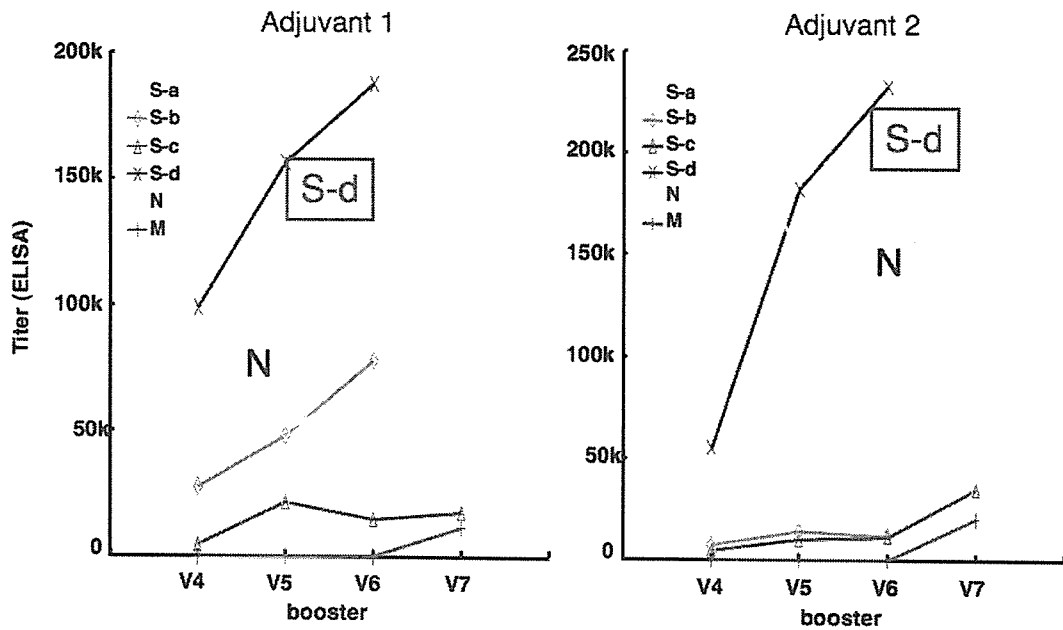
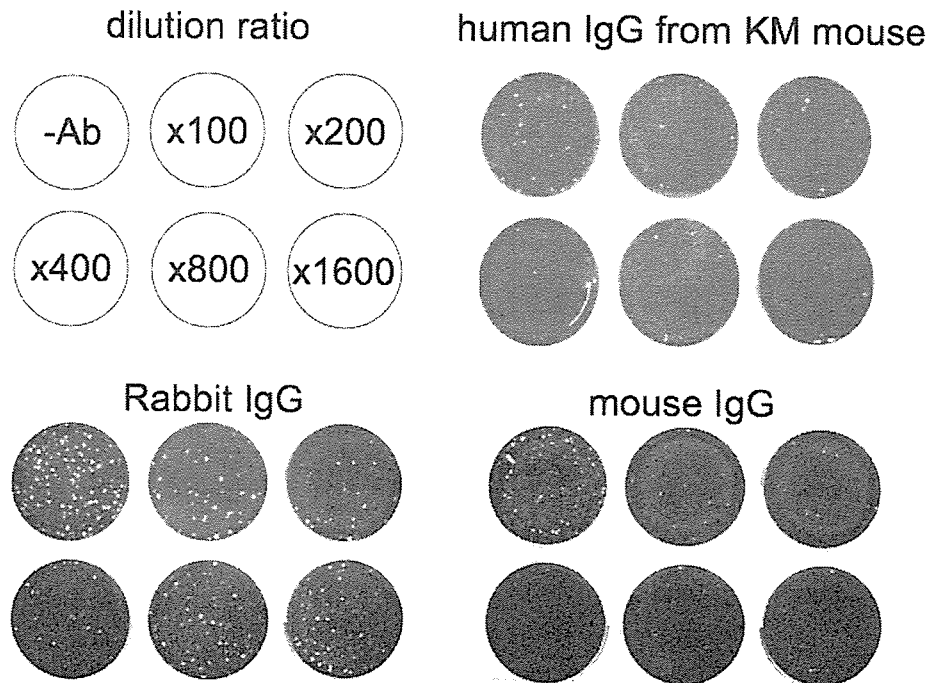


図 6

in vitro SARS-CoV neutralization by the IgG preparations



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	Natruue 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)

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。

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 μ g/ml	6.1 μ g/ml	31 μ g/ml	27 μ g/ml
S-d	NO	NO	-	35 μ g/ml
N	NO	NO	-	NO

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年中には終息を遂げた。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