

図1 2002～2003年におけるSARS-CoVのアウトブレイク

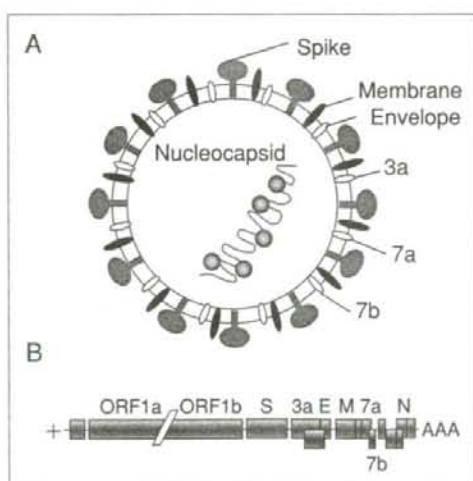


図2 SARS-CoVの構造

A: SARS-CoVの概略図. B: SARS-CoVのゲノム構造.

SARS-CoVに対する免疫反応

SARS-CoVに感染したマウスの血清がSARS-CoVの増殖を抑えたことから、中和抗体が感染制御に重要であることが示唆された。とくに、中和抗体の抗原決定基がRBDに存在するので、S蛋白が中和抗体の抗原としてもっとも重要と思われる。実際に、感染から回復したヒトの血清に、S蛋白のみに対する中和抗体が存在した¹⁾。

一方、SARS-CoVに対する細胞性免疫の役割は、よくわかっていない。急性期では、患者の95%でCD4⁺、CD8⁺T細胞数の減少がみられるが、回復するにつれてT細胞数は増加する。また、

あるHLA class IアレルがSARSの病状に関係しているため、CD8⁺細胞傷害性T細胞(CTL)が一定の役割をしていると考えられる。実際に、感染回復患者において、CTLが強力に誘導され、SやN蛋白からCTLエピトープが同定された。Yangら²⁾によると、S蛋白を発現するDNAワクチンによって中和抗体とS特異的CTLが誘導されたが、SARS-CoVの増殖を抑えたのは中和抗体であった。しかし、CTLはS蛋白などの構造蛋白のみでなく、調節性蛋白に対しても誘導できる。CTLのドミナントエピトープが、小さなS蛋白ではなく、大きな調節性蛋白領域に存在すると考えることは可能である。最近、SARSから自然に回復したヒトの免疫反応を調べたところ、強いCTLが検出された³⁾。これは、他のウイルス感染症と同様に、CTLが宿主防御に重要であることを強く示唆している。驚いたことに、NK、NK-T、およびT/B細胞欠損マウスでは、正常マウスと同様、チャレンジしたSARS-CoVを排除した¹⁾。しかし、マウスはSARS-CoVに感染するが、症状はきわめて軽度である。したがって、この結果を単純にヒトに当てはめるべきではない。

SARSワクチン

上述のように、S蛋白に対する中和抗体が、ウイルスの排除に効果があると思われる。したがって、今までのワクチン研究では、S蛋白に対する体液性免疫に焦点がおかれた。しかし、ネコのコロナウイルス(FIPV)の感染では、antibody-de-

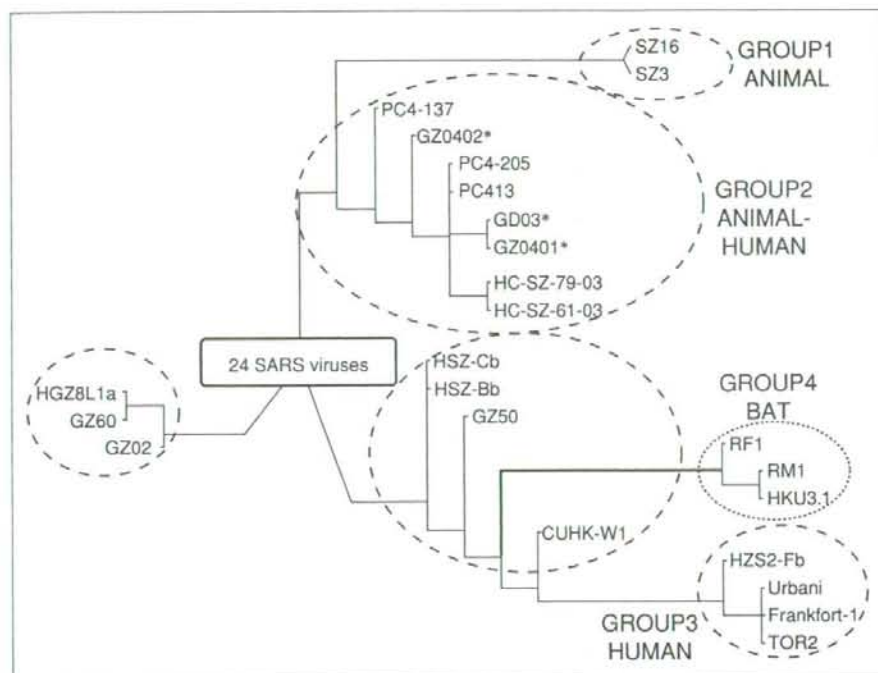


図3 SARS-CoVの系統樹

グループ1：2003年に中国南部でハクビシンから得られたウイルス，グループ2：ハクビシンやタヌキから得られたウイルス，および2003～2004年にヒトに散発的に発生したウイルス，グループ3：2002～2003年にヒトに流行したウイルス，グループ4：2005～2006年にキクガシラコウモリから得られたウイルス．グループ3と4の間の太線は，系統発生的にずっと離れていることを示している．

pendent enhancementがみられる．この現象は，FIPVに感染してS蛋白に対する中和抗体が誘導されたネコが，FIPVに再度感染すると，初感染よりずっと重篤になるという現象である³⁾．今のところ，FIPVに限ってみられる現象であるが，同じ科に属するSARS-CoVにおいて可能性がないわけではない．さらに，S蛋白がマウスに急性の肺損傷を起こすことがわかった⁴⁾．SARS-CoVのレセプターであるACE2は，ACEとともにレニン-アンジオテンシン系における相同蛋白質である(図4)．ACEは肺の損傷をひき起こすが，ACE2はこの系で負の調節因子として作用する．SARS-CoVが感染した場合，S蛋白はACE2に結合してその発現を減少させ，肺の損傷を促進する．2003～2004年に散発的に発生したウイルスは，2002～2003年に流行したウイルスよりずっと病原性が低かったが，これは，S蛋白変異のために，ACE2への結合力が弱く，それにより肺炎の症状が軽

度であったと推測されている．もし，中和抗体を誘導するためにS蛋白を産生するワクチンが投与された場合，上述の機構により重症の肺炎に陥るかもしれない．

以上のようなことから，実験的に効果があるからといってS蛋白に対する中和抗体を誘導するワクチンのみに的を絞るのは危険である．一般に，ウイルスに対する免疫防御反応は，体液性免疫と細胞性免疫が両輪として働く必要があるため，SARSにおいても，両方を誘導する方法を探索することが必要であろう．CTLの大きな特徴は，そのウイルス由来の蛋白質すべてに対して，CTLが誘導できるという点である．変異したS蛋白は中和抗体に抵抗性を示す⁵⁾が，CTLでは，変異の少ないN蛋白や調節性蛋白質に対しても誘導することが可能であり，アミノ酸変異による影響を最小限に抑えられる．SARS-CoVの場合，きわめて大きなORF1aと1bがあり，そこにドミナントエ

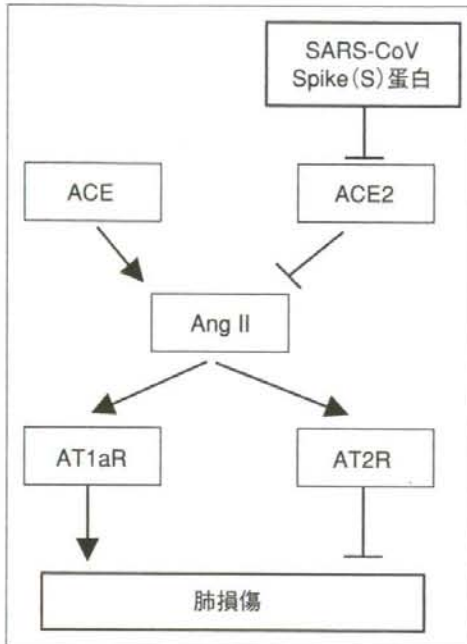


図4 SARS-CoVのS蛋白による急性肺損傷の機構
アンジオテンシン変換酵素(ACE)はアンジオテンシンI(Ang I)を切断してAng IIを産生する。Ang IIは、アンジオテンシンII type 1a受容体(AT1aR)に結合して肺の損傷をひき起こしたり、アンジオテンシンII type 2受容体(AT2R)に結合して肺損傷を減じたりする。一方、SARS-CoVのレセプターであるACE2は、Ang IIを不活性化してこの系における負の調節因子として作用する。SARS-CoVが感染した場合、そのS蛋白はACE2に結合してACE2の発現を減少させ、肺の損傷を促進する。

ビトープが存在する可能性は高い。そのように保存されたエピトープに対するCTLを誘導できれば、ヒトのSARS-CoVとともに、動物に自然感染し、いつかまた再興してヒトに猛威を振るうであろうSARS-CoV様ウイルスの両方を防御しうのようなワクチンが開発できるかもしれない。

SARSワクチンの開発

今までに、さまざまなワクチン候補が報告されたが、それぞれ長所短所があり(表1)、実用化できる方法はまだ確立されていない(表2)。

1. 不活化SARS-CoV

不活化したSARS-CoVを使ったワクチン法は、安全で確実に体液性免疫を誘導できる。しかし、不活化ウイルス作製のために、危険なウイルス

を大量に培養する必要がある。また、細胞性免疫の誘導はほとんど期待できない。

SARS-CoVは、UVやホルマリンで不活化できる。Spruthら⁵⁾は、安全のため、ホルマリンとUVの2段階でウイルスを不活化した。それをマウスに免疫したところ、中和抗体やIFN- γ を誘導して、SARS-CoVのチャレンジにも抵抗性を示した。また、 β -プロピオラクトンで不活化したSARS-CoVは、マウスに中和抗体を誘導し、組換えアデノウイルスより効率よくSARS-CoVの増殖を抑制した⁶⁾。

2. 弱毒化SARS-CoV

E遺伝子を除去して弱毒化したSARS-CoVは、ハムスターに中和抗体を強力に誘導した⁷⁾。そして、Urbani株(グループ3)だけでなく、GD03株(グループ2)の増殖も抑制した。しかし、安全性の点では疑問である。

3. サブユニットワクチン

サブユニットワクチンは、ウイルスを含まないので安全である。しかし、抗原性が低いので、免疫アジュバントとともに、複数回投与する必要がある。

S蛋白全体または一部をマウスに免疫した実験が多く報告されている。Heら⁸⁾は、Tor2株(グループ3)、GD03株(グループ2)、およびSZ3株(グループ1)のRBDの組換え蛋白をFcと融合させ、マウスやウサギに免疫した。その結果、それぞれのウイルス株に対する中和抗体が誘導された。しかし、Tor2-RBDで免疫したマウスから作製した単クローン抗体はすべてTor2、GD03を中和したが、SZ3に対しては、中和するものとならないものが存在した。したがって、エピトープを選べば、ウイルスの種を超えて効果があることがわかった。

4. Virus-like particles (VLPs)

VLPsは、ゲノムがないのでウイルス増殖はしないが、本来のウイルス粒子と同じ構造をもち、細胞指向性が同じなのでワクチンに利用できる。Luら⁹⁾は、SARS-CoVのS、M、Eを発現するバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させて、VLPsを作製した。これは、マウスに中和抗体と細胞性免疫を誘導した。

5. 組換えウイルス

ウイルスベクターは、強い体液性免疫と細胞

表1 各種ワクチン法の利点と欠点

ワクチン	利点	欠点
不活化ウイルス	ウイルスの複製がないので、安全で、安定である。 体液性免疫の誘導が期待できる。	強い細胞性免疫の誘導は期待できない。 不活化ウイルスを作製するために、危険なウイルスを大量に培養するので危険である。 不完全な不活化による、ウイルス感染の危険性。
サブユニット	安全性が高い。 容易に大量生産できる。	免疫原性が弱いので、複数回投与する必要がある。 抗原性のある蛋白質、またはエпитープを探す必要がある。
組換えウイルス	体液性免疫と細胞性免疫の両方を強力に誘導できる。	免疫不全のヒトに使用する場合、危険性を伴う。 弱毒株が野生株に変わる危険性がある。
DNAワクチン	体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導できる。 安全性、安定性が高い。 容易に作製できる。	免疫原性が弱い。

表2 SARSワクチンの開発

ワクチン	特徴	抗原	動物	結果	文献
不活化 SARS-CoV	UVとホルマリン	ウイルス全体	BALB/c	中和抗体、細胞性免疫 SARS-CoVに対する防御反応	5
	β-プロピオラク トン	ウイルス全体	129S6/SvEvマ ウス	SARS-CoVに対する防御反応 アデノウイルスより良し	6
弱毒化 SARS-CoV	E 遺伝子欠損	E 蛋白を除くウ イルス全体	ハムスター	中和抗体 SARS-CoVに対する防御反応	7
サブユニット	Fcとの融合蛋白	ヒト、ハクビシ ン由来ウイルス のRBD(S蛋白)	BALB/cマウス ウサギ	中和抗体 それぞれのウイルス株に対する交 差防御反応	8
VLPs	バキューウイルス による	S, M, E 蛋白	BALB/c	中和抗体 細胞性免疫	9
組換えウイルス	MVA	S 蛋白	BALB/c	中和抗体 SARS-CoVに対する防御反応	10
	MVA	S 蛋白	フェレット	中和抗体、肝炎発症	11
	アデノウイルス	S, N 蛋白	アカゲザル	中和抗体、T 細胞反応	12
	水疱性口内炎ウ イルス	S 蛋白	BALB/c	中和抗体 SARS-CoVに対する防御反応	13
	アデノ随伴ウイ ルス	RBD(S 蛋白)	BALB/c	中和抗体、CTL SARS-CoVに対する防御反応	14
DNAワクチン		S 蛋白	BALB/c	中和抗体、T 細胞 ウイルス防御は中和抗体による	2
	calreticulin遺伝 子挿入	N 蛋白	C57BL/6	中和抗体、CTL 組換えウイルスに対する防御免疫	15
プライム・ ブースト	DNA・アデノウ イルス	N 蛋白	BALB/c	抗体、IFN-γ産生	16

性免疫の両方を誘導するため、ワクチンの有力な候補である。したがって、さまざまな弱毒化ウイルスで組換え生ワクチンの開発が行われている。しかし、免疫不全患者に投与する場合など、危険性は残る。

(1) ワクシニアウイルス

いくつか弱毒株があるが、modified vaccinia virus Ankara(MVA)がもっとも広く使用されている。

Bishtら¹⁰⁾は、S 遺伝子をMVAに組み込んで、マウスに免疫し中和抗体を誘導した。そして、SARS-CoVに対する防御効果を示した。一方、Weingartlら¹¹⁾は、S 遺伝子を組み込んだMVAをフェレットに免疫したが、SARS-CoVの感染によって肝炎が発症したため、ワクチンの副作用を提言した。

(2) アデノウイルス

アデノウイルスは、組み込まれた外来抗原に

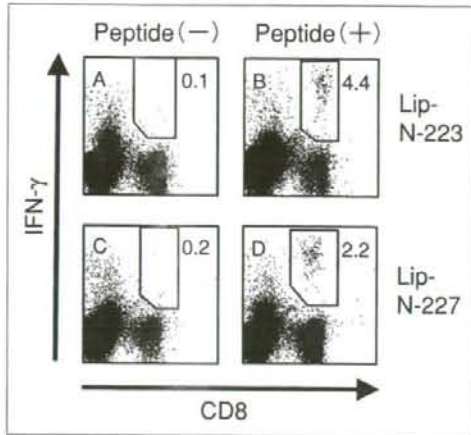


図5 ペプチド結合リポソームによる, SARS-CoV-N 特異的CTLの誘導

SARS-CoVのN蛋白由来ペプチド, N-223およびN-227を結合したペプチド結合リポソーム (Lip-N-223, Lip-N-227)でHLA-A2トランスジェニックマウスを免疫して7日後, その脾細胞を調整した。そして, それぞれのペプチドの存在 (B, D), 非存在 (A, C)下で5時間培養し, CD8と細胞内IFN- γ を染色して, フローサイトメトリーで解析した。数字は, CD8細胞中のIFN- γ 陽性細胞の%である。

対して, 抗体だけでなくCTLを強力に誘導するので, 広く利用されている。SとN遺伝子を組み込んだアデノウイルス複製欠損株で, マウスやアカゲザルを免疫したところ, 中和抗体とともに強いT細胞反応が誘導された¹²⁾。

(3)他の組換えウイルス

他に, 水疱性口内炎ウイルス¹³⁾やアデノ随伴ウイルス¹⁴⁾などが利用されている。それぞれに, SかN遺伝子が組み込まれ, 実験動物に中和抗体やCTLを誘導した。

6. DNAワクチン

DNAワクチンは, 安全で作製が容易であり, 体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導するため, さまざまな研究室で開発が試みられている。しかし, 免疫原性が弱いのが難点である。Yangら²⁾は, SARS-CoVのS遺伝子を組み込んだ発現プラスミドでマウスを免疫し, SARS-CoVに対するDNAワクチンの最初の報告を行った。また, 抗原提示を促進するcalreticulin遺伝子¹⁵⁾を加えて, 免疫の誘導を向上させた。しかし, DNAで初回免疫(プライム)した後に, 同じ抗原遺伝子を含む組換えウイルスで2次免疫(ブースト)すると

強力に体液性免疫と細胞性免疫を誘導できることがわかったため, 最近では, このプライム・ブースト法が主流である¹⁶⁾。

7. ペプチド結合リポソーム

われわれは, 合成ペプチドをリポソーム表面に結合させてマウスに免疫することで, 強力にペプチド特異的CTLを誘導できることを示した¹⁷⁾。このペプチド結合リポソームは抗原特異的IgE産生がみられないため, アレルギー反応を惹起しにくいワクチンの担体となりうる。われわれは, このペプチド結合リポソームを利用して, SARSに対するCTL誘導型ワクチンの開発を試みている(図5)。

おわりに

重症急性呼吸器症候群(SARS)の発生はここ数年みられないが, ウイルスは自然宿主に潜んでいる。したがって, またいつか, 種の壁を越えてヒトに猛威を振るうであろう。われわれは, 人獣の両方に感染する株に対しても防御反応を提供できるようなワクチンを開発する必要がある。それには, 体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導するようなワクチンが理想である。SARSから自然に回復したヒトの免疫機構を理解することは重要である。また, 動物モデルの確立, SARSのpathologyの理解は, 副作用のない, 安全で効率的なワクチンの開発に必要である。

文 献

- 1) Enjuanes L, DeDiego ML, Alvarez E, et al. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res* 2008; 133: 45.
- 2) Yang ZY, Kong WP, Huang Y, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004; 428: 561.
- 3) Li T, Xie J, He Y, et al. Long-term persistence of robust antibody and cytotoxic T cell responses in recovered patients infected with SARS coronavirus. *PLoS ONE* 2006; 1: 1.
- 4) Wang H, Rao S, Jiang C. Molecular pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Microbes Infect* 2007; 9: 119.

- 5) Spruth M, Kistner O, Savidis-Dacho H, et al. A double-inactivated whole virus candidate SARS coronavirus vaccine stimulates neutralising and protective antibody responses. *Vaccine* 2006 ; 24 : 652.
- 6) See RH, Zakhartchouk AN, Petric M, et al. Comparative evaluation of two severe acute respiratory syndrome (SARS) vaccine candidates in mice challenged with SARS coronavirus. *J Gen Virol* 2006 ; 87 : 641.
- 7) Lamirande EW, DeDiengo ML, Roberts A, et al. A live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and efficacious in golden syrian hamsters. *J Virol* 2008 ; 82 : 7721.
- 8) He Y, Li J, Li W, et al. Cross-neutralization of human and palm civet severe acute respiratory syndrome coronaviruses by antibodies targeting the receptor-binding domain of spike protein. *J Immunol* 2006 ; 176 : 6085.
- 9) Lu X, Chen Y, Bai B, et al. Immune responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus induced by virus-like particles in mice. *Immunology* 2007 ; 122 : 496.
- 10) Bisht H, Roberts A, Vogel L, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 6641.
- 11) Weingartl H, Czub M, Czub S, et al. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *J Virol* 2004 ; 78 : 12672.
- 12) Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 2003 ; 362 : 1895.
- 13) Kapadia SU, Simon ID, Rose JK. SARS vaccine based on a replication-defective recombinant vesicular stomatitis virus is more potent than one based on a replication-competent vector. *Virology* 2008 ; 376 : 165.
- 14) Du L, Zhao G, Lin Y, et al. Intranasal vaccination of recombinant adeno-associated virus encoding receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) spike protein induces strong mucosal immune responses and provides long-term protection against SARS-CoV infection. *J Immunol* 2008 ; 180 : 948.
- 15) Kim TW, Lee JH, Hung CF, et al. Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2004 ; 78 : 4638.
- 16) Ma C, Yao K, Zhou F, et al. Comparative immunization in BALB/c mice with recombinant replication-defective adenovirus vector and DNA plasmid expressing a SARS-CoV nucleocapsid protein gene. *Cell Mol Immunol* 2006 ; 3 : 459.
- 17) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent anti-tumor immunity. *J Immunol* 2006 ; 177 : 2324.

* * *