

# 余 福勲 論文内容の要旨

## 主 論 文

Evaluation of Inapparent Nosocomial Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by Use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

遺伝子工学的手法による SARS コロナウイルス N 蛋白の作製とそれを用いた特異的 ELISA 法によるベトナムにおける無症候性院内感染の評価

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria Del Carmen Parquet, and Kouichi Morita

CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY  
12 巻 7 号 848-854 2005 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員：森田 公一)

### 【緒 言】

重症急性呼吸器症候群( SARS )は近年出現した致死性の肺炎をおこす新興感染症である。現在、最も広く使用されている SARS 血清診断系は SARS-CoV 感染細胞を用いた間接免疫蛍光法と培養細胞抽出物を抗原として用いた ELISA 法であるが、SARS-CoV とヒトコロナウイルス 1 群間の抗原性交叉に加え、SARS-CoV 感染細胞や細胞抽出物の処理過程で研究者が SARS に感染する危険性がある。実際、実験室内感染がシンガポールや台湾、北京で発生したことから SARS 診断系の安全性に関する懸念は高まっており、SARS 診断のより安全で便利な方法の開発が必要である。また、SARS の疫学は未だに十分には理解されておらず SARS-CoV 不顕性感染がどの程度存在するかも未だ明らかではない。本研究では組み換え DNA 技術を利用して SARS-CoV の N 蛋白質を一部切断して用いた安全で特異性の高い ELISA 法による血清診断系を確立し、SARS 流行に対応したベトナム人医療従業者の SARS-CoV 不顕性感染を詳細に検討した。

### 【対象と方法】

SARS-CoV の N 蛋白遺伝子全領域および、N 蛋白の N 末端 121 アミノ酸部位を欠損させた cDNA をそれぞれ RT-PCR にて増幅し、発現ベクターにクローニングした。これら組み換え cDNA を大腸菌に導入し発現させアフィニティークロマトグラフィーにて目的の蛋白質を精製した。精製した蛋白質は抗 SARS-CoV 血清を用いた Western Blot 法にて SARS 由来の蛋白質であることを確認した。上記 2 種の組み換え抗原を用いて間接 IgG ELISA 系を作成し、ベトナム人の健常者血清 175 検体、SARS 患者から採集していた血清 37 検体、SARS 患者を担当した無症状のベトナム人医療

従事者 112 人の抗体を測定しその ELISA 抗体価を測定し、ウイルス中和抗体価を比較した。

## 【結 果】

N 蛋白の全領域と N 末端 121 アミノ酸を欠損させた蛋白質(それぞれ、SARS-CoV N'、SARS-CoV N<sub>121</sub> と呼ぶ)はともに大腸菌で良く発現した。健常者血清では N 蛋白を用いた ELISA 法は高い非特異反応を示したのに対し、N<sub>121</sub> 蛋白を用いた ELISA 法は大幅に低い非特異反応であった。この N<sub>121</sub> 蛋白を用いた ELISA 法と、SARS-CoV 感染細胞可溶性抗原を用いた ELISA 法を用いて SARS 患者のペア血清の抗体を測定した結果、前者では 97.3%の抗体陽転率であったのに対して、後者は 56.8%であった。また 2 つの方法で測定された抗体価の最高値はそれぞれ 204,800 と 6,400 であった。また、SARS 発症後に抗体陽転が確認されたのは N<sub>121</sub> 蛋白では最短 6 日目であったのに対し、SARS-CoV 感染細胞可溶性抗原では 9 日であった。SARS 患者と密接な接触があったが症状は見られなかったベトナム人医療従事者 112 人の検査については、N<sub>121</sub> 蛋白を使った IgG ELISA 法を用いて検査した場合、4 名が陽性と判定された。この 4 名については、Western Blot 法と中和試験で 4 人全ての感染が確認され不顕性院内感染が発生していたことが証明された。顕性感染率は 24.8%であるのに対して、不顕性院内感染率は(2.7%) (p<0.001)である。

## 【考 察】

既知のヒトコロナウイルス N 蛋白質のアミノ酸配列は比較的良好に保存されており、SARS-CoV の N 蛋白質の N 末端とも相同性が高い。SARS-CoV N' と健常者血清との非特異反応は、健常者の多くがすでにヒトコロナウイルスに感染していたために発生した交叉反応である可能性が高い。事実、全コロナウイルス種の N 蛋白の N 末端には高度に保存されたモチーフ(FYYLGTPG)が存在する。したがって、この部位を欠損した N<sub>121</sub> 蛋白を用いた ELISA 法は SARS を診断するのにより特異性の高い抗体検出系であると思われる。今後、種々のヒトコロナウイルスと SARS-CoV の交叉反応の検証は継続的に必要であろう。またこのことは、SARS コロナウイルスの組み換え N 蛋白全領域や、ウイルス全粒子や感染細胞抽出物を抗原としてヒトや他の動物種における SARS コロナウイルス感染の診断に用いる場合その試験結果の解釈には注意を要すると思われる。とくに不顕性感染の評価においてはなおさらである。今回作成した、N<sub>121</sub> 蛋白を用いた IgG ELISA 法と従来法の比較では N<sub>121</sub> は特異性と感度の感度が高く、安価で安全な ELISA 用診断抗原であることが示され、本法は臨床診断および大規模な血清疫学調査にとって有用である。

SARS-CoV の顕性感染率においては研究者ごとに高低、種々の意見が錯綜している。これらの知見は従来の抗体検出系を用いて実施された検査に基づいており、感度が極めて低い場合やヒトコロナウイルスとの交叉反応による擬陽性を SARS 感染陽性と判定している可能性が高い。今回、我々は N<sub>121</sub> とウイルス中和法により詳細に検討した結果、ベトナム医療従事者においては不顕性感染は存在するがきわめて低く、顕性感染の約 10 分の 1 の頻度であると判断した。