

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450418

研究課題名(和文) MERSコロナウイルス自然宿主動物同定に向けた基盤技術の構築

研究課題名(英文) Development of serological assays for determining MERS coronavirus neutralizing antibody responses

研究代表者

福士 秀悦 (FUKUSHI, SHUETSU)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：80373398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2012年、中東呼吸器症候群(MERS)の原因としてMERSコロナウイルス(MERS-CoV)が報告されて以降、血清学的手法による患者血清中の抗体測定および、動物からヒトへウイルスの感染源の調査が行われてきた。本研究では、VSVシュードタイプを用いたハイスループットなウイルス中和抗体測定法を開発した。さらにMERS-CoVのS蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた競合ELISA法を開発した。本研究で開発したVSVシュードタイプによる中和抗体測定法および、競合ELISA法はMERSの血清疫学に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Since discovering the MERS coronavirus (MERS-CoV) as a causative agent of severe respiratory illness in the middle east in 2012, a serological antibody testing has been conducted not only for assessing antibody responses of infected patients but also for investigating zoonotic origins of MERS-CoV. In this study, we developed a high-throughput virus neutralization assay using pseudotyped vesicular stomatitis virus (VSV)-bearing MERS-CoV S protein (MERSpv). In addition, we generated monoclonal antibody (MAb) against S protein, and developed an MAb-based competitive ELISA (cELISA) to detect MERS-CoV antibody. Both VSV pseudotype-based and cELISA are useful for the epidemiological investigation on MERS-CoV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：MERSコロナウイルス 血清疫学

1. 研究開始当初の背景

2012年、中東呼吸器症候群(MERS)の原因としてMERSコロナウイルス(MERS-CoV)が報告されて以降、血清学的手法による患者血清中の抗体測定および、MERS-CoV自然宿主探索のため、各種動物の抗体保有調査が行われてきた。

MERS-CoVは他のコロナウイルスと血清学的に交叉することから、MERS-CoV特異的な抗体検出法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、水疱性口炎ウイルス(VSV)シュードタイプを用いた、ハイスループットなMERS-CoV中和抗体検出法および、MERS-CoVに対するモノクローナル抗体を利用した競合ELISAによるMERS-CoV特異的な抗体検出法を開発し、MERS-CoV血清診断および自然宿主動物同定に向けた基盤技術の構築を行う。

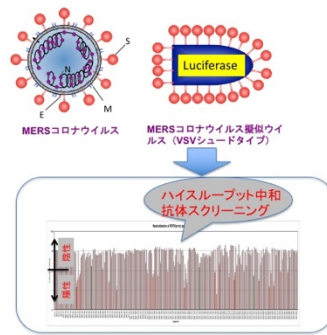
3. 研究の方法

①MERSコロナウイルスのS蛋白質を被ったVSVシュードタイプを作製した。MERSコロナウイルスS蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、これらの性状解析を行った。さらに、②モノクローナル抗体を用いた競合ELISA法の検討を行った。MERS-CoV蛋白質を免疫した各種実験動物血清、エチオピアのヒトコブラクダから採取された血清を用いて、これらの抗体検出系の有用性を検討した。

4. 研究成果

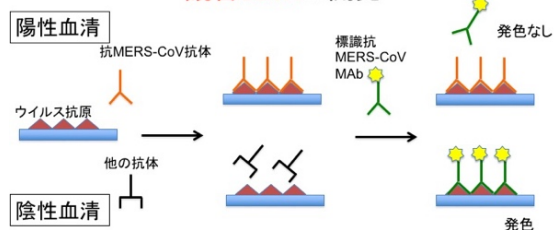
① VSVシュードタイプの感染はMERS-CoV S蛋白質免疫血清により特異的に阻害されたことから、これを用いたMERS-CoV中和抗体測定が可能であると考えられた。このVSVシュードタイプはルシフェラーゼ遺伝子を組み込んであるため、96well plateを用いたハイスループットな測定系である。(図1)

[図1] MERS-S VSVシュードタイプによる中和試験



② 作製したモノクローナル抗体はMERS-CoVに対する中和活性を有していた。また、中和作用からエスケープするウイルスの解析から、これらのモノクローナル抗体のエピトープはMERS-CoV S蛋白質の受容体結合部位に存在することを明らかにした。このモノクローナル抗体を利用した競合ELISAを開発した(図2)。エチオピアのヒトコブラクダから採取された血清を用いて競合ELISAを実施し、MERS-CoVに対する中和活性と比較したところ、競合ELISAは感度98%、特異度100%であった。また、競合ELISA法における発色阻害の程度(% inhibition)は、MERS-CoVに対する中和抗体価と相関した。これらの結果から、本研究で開発した競合ELISAにより、MERS-CoVに対する抗体を特異的に検出することが可能であり、動物血清等のスクリーニングに有用であると考えられた。

(図2) MERS Sに対するモノクロを使った競合ELISAの開発



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. J Virol Methods. 2018 Jan;251:22-29.

〔学会発表〕(計 2件)

1. VSV pseudotype and monoclonal antibody-based assays for determining MERS coronavirus neutralizing antibody responses. Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Hideki Tani, Takeshi Kurosu, Satoshi Taniguchi, Kazutaka Egawa, Shumpei Watanabe, Masayuki Shimojima, Kazuya Shirato, Shutoku Matsuyama, Hanako Sekimukai, Naoko Iwata-Yoshikawa, Noriyo Nagata, Kazuo Ohnishi, Manabu Ato, Hiroshi Sentsui, and Masayuki Saijo. Kansas City 米国 June 2017.

2. Development of competitive ELISA for detecting serologic responses to MERS-CoV using novel monoclonal antibodies against spike protein. Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Shumpei Watanabe, Masayuki Shimojima, Kazuya Shirato, Shutoku Matsuyama, Naoko Iwata-Yoshikawa, Noriyo Nagata, Kazuo Ohnishi, Manabu Ato, Hiroshi Sentsui, and Masayuki Saijo. 大阪 2017年10月.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: MERS コロナウイルスのS蛋白質に対するモノクローナル抗体を利用したMERSコロナウイルス特異的抗体検出法

発明者: 福士秀悦、他5名

権利者: 国立感染症研究所

種類: 特許

番号: 特願 2017-107132

出願年月日: 平 29. 5. 30

国内外の別: 国内

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 福士秀悦

(FUKUSHI, Shuetsu)

国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官

研究者番号: **80373398**

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()