

200400602A

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年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年3月

主任研究者

切 替 照 雄

目 次

I. 総括研究報告書		
ヒト型抗SARS中和抗体の開発研究	1
II. 分担研究報告書		
1. 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	5
2. 中国との研究調整	笹月 健彦	9
3. 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		
	七條 茂樹	13
4. ウイルス中和活性の測定	田代 真人	17
5. ヒト型ウシを用いたヒト型抗体の作成		
	石田 功	21
III. 研究成果の刊行物・別刷	31

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

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 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、ヒト型ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発を行うことである。本年度は、SARS ウイルス中和抗体エピトープを同定する目的で、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をした。さらに、これらのペプチドに多重抗原ペプチド (MAP) 修飾したもの、さらにマウス MHC クラス II 結合配列と融合させたものを設計し抗原ペプチドを合成した。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、発現および精製を進めた。さらに、日中共同研究によるサル SARS ウイルス感染実験に関する共同研究契約の締結を進めた。

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 protein 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型マウスに免疫し、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、ヒト型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も多大な貢献をするのみならず、経済的にも大切であ

る。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。

B. 研究方法

1. 抗原ペプチドの候補選定

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。

$100 \cdot 1$ の color-coded beads を $100 \cdot 1$ 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) $2 \cdot 1$ を、ペプチドを結合させた color-coded beads $25 \cdot 1$ 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、 $100 \cdot 1$ streptoavidin-PE と室温で 30 分間反応させた後 3 回洗浄し、 $100 \cdot 1$ 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 (2 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。

2. 抗原ペプチドのデザイン

結果で述べるように選定された SARS 患者に特異的なペプチドの配列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。

3. 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。

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नावirus 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った。

5. 中国との研究調整

笹月は、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った。

これらの話し合いを基に、切替や石田功を中国に派遣し、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. 抗原ペプチドの候補選定

SARS-CoV ゲノムに存在する 14 個の ORF のうち、ウイルス粒子表面に存在すると考えられる spike 蛋白質、membrane 蛋白質、および以前に他のコロナウイルスで中和抗体誘導抗原となることが報告されている nucleocapsid 蛋白質、の 3 つの蛋白質を抗原候補として選択した。これらについて、197 種類の重なり合うように設計された 15mer のペプチドを合成し、感染後 6 ヶ月のベトナム SARS 患者 78 名から採取した血清中の IgG との反応性を検証して、抗原ペプチド候補を絞りこんだ。

2. 抗原ペプチドのデザイン

選定された SARS 患者に特異的な 3 つのペプチド (S791: PLKPTKRSFIEDLLF, N161 QLPQGTTLPKGFYAE, M207 TDHAGSNDNIALLVQ) の配列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。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。

3. 組換え蛋白質の調整

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を試みた。spike 蛋白質は全長の他、全体を 4 つの断片に分けた設計とした。membrane 蛋白質は C 末端側領域を選択した。nucleocapsid 蛋白質は分子全体を抗原とした。これらを His-Tag 融合蛋白質として大腸菌で発現後、Tag のアフィニティ精製を行い、さらに Tag 除去を実施する計画とした。デザインされた総計 8 個の組換え蛋白質について発現・精製・Tag 除去の各段階の検討を行った結果、すべての蛋白質に

ついて発現に成功し、うち 7 個で精製を完了、4 個で Tag 除去を完了し、抗原としての調整を終了した。

4. 抗体中和活性試験の確立

Vero E6 細胞の細胞変性を指標としたヒト型抗体の中和試験を確立してプロトコールを作成した。

5. 中国との研究調整

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った。中国医学科学院実験動物研究所共同研究として SARS サル感染実験を実施できる可能性があることが分かった。

また、将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

D. 考察

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、本年度は、以下の 4 項目を実施し、大きな進展があった。特に抗原の候補ペプチド及び蛋白質のほとんどが調整でき、ヒト型マウスへの免疫をはじめた。また、中和活性試験方も最適化が進んだ。中国との共同研究特にサル感染実験の共同研究契約の交渉が進んだ。来年度は、中和活性を持つ抗体作成のための最適な抗原の同定、ヒト型マウスを免役したサル実験用の抗体調整、中国との共同研究契約締結と共同研究の開始を目指す。

1. 抗原ペプチドの候補選定
2. 抗原ペプチドのデザイン
3. 組換え蛋白質の調整
4. 抗体中和活性試験の確立
5. 中国との研究調整

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、本年度は、抗原ペプチドの候補選定、抗原ペプチドのデザイン、組換え蛋白質の調整、抗体中和活性試験の確立、中国との研究調整

以下の 4 項目を実施し、大きな進展があった。

II. 分担研究報告書

研究要旨

SARS ウイルス中和抗体エピトープを同定する目的で、分担研究者(笹月、七條)ら共同で 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エピトープの同定をした。抗原結合蛍光ビーズを用いたフローメトリーにより、少量の血清で迅速かつ安全に測定できる方法を用いて、SARS ウイルスの構造タンパク由来 15 残基のアミノ酸からなる 5 残基オーバーラップペプチド 197 種類を3名の急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42 種類のペプチドが陽性であった。これらのペプチドのうち、健常人・非 SARS 感染患者血清に比べて感染 6 ヶ月後に採血した患者(45 名)血清で認識されるペプチドを3種類 (S791, M207, N161) 同定した。これらのペプチドに多重抗原ペプチド (MAP) 修飾したもの、さらにマウス MHC クラス II 結合配列と融合させたものを設計し、抗原ペプチドを合成した。

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。

本研究では、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、表面抗原である spike protein 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た。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試みた。最終的には、これらエピトープを含むオリゴペプチドをヒト型マウスに免疫し、それらに対する SARS ウイルス中和抗体を開発する。

B. 研究方法

1. 抗原ペプチドの候補選定

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 \cdot l の color-coded beads を 100 \cdot 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 \cdot l を、ペプチドを結合

させた color-coded beads 25・1 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・1 streptoavidin-PE と室温で 30 分間反応させた後 3 回洗浄し、100・1 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（P 3 相当）内で行った。N 9 5 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(2 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。

2. 抗原ペプチドのデザイン

結果で述べるように選定された SARS 患者に特異的なペプチドの配列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。

(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-CoV ゲノムに存在する 14 個の ORF のうち、ウイルス粒子表面に存在すると考えられる spike 蛋白質、membrane 蛋白質、および以前に他のコロナウイルスで中和抗体誘導抗原となることが報告されている nucleocapsid 蛋白質、の 3 つの蛋白質を抗原候補として選択した。これらについて、197 種類の重なり合うように設計された 15mer のペプチドを合成し、感染後 6 ヶ月のベトナム SARS 患者 78 名から採取した血清中の IgG との反応性を検証して、抗原ペプチド候補を絞りこんだ。

選定された SARS 患者に特異的な 3 つのペプチド (S791: PLKPTKRSFIEDLLF, N161 QLPQGTTLPKGFYAE, M207 TDHAGSNDNIALLVQ) の配列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 (Dalum et al. J Immunol. 1996 157(11):4796-804)、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。

D. 考察

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。従って、タンパク質抗原を用いた ELISA で抗体を測定すると、交差反応性抗体が検出される可能性がある。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。一方、SLE 患者血清でも、SARS-CoV 由来のタンパク抗原を用いた ELISA で測定すると交差反応が認められることが報告 (Wang et al, 2003) されている。オーバーラップペプチドに対する抗体の測定でも、SLE 患者血清で交差反応するペプチドが検出され、自己抗原に対する抗体が SARS-CoV 由来ペプチドと交差反応することが示唆された。これらのことから、健常人血清、各種感染症、自己免疫疾患などの患者血清中抗体が交差反応しない特定のペプチド抗原を選別する。即ち本研究で同定した 3 種類のペプチドを用いた抗体の測定は特異性を確保する意味からも有用であることが示唆された。

選定された SARS 患者に特異的な 3 つのペプチド (S791, N161, M207) の配列を元にペプチドを合成した。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 種類の抗原ペプチドを合成した。

E. 結論

SARS 患者血清と反応する多数の抗原エピトープを同定した。この情報をもとに、総計 4 種類の抗原ペプチドを合成した。次年度以降、これらをヒト型マウスに免疫し、それらに対する SARS ウイルス中和抗体の有無を検定する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Shichijo S, Keicho N, Long HT, Quy T, Phi NC, Ha LD, Ban VV, Itoyama S, Hu CJ, Komatsu N, Kirikae T, Kirikae F, Shirasawa S, Kaji M, Fukuda T, Sata M, Kuratsuji T, Itoh K, Sasazuki T. Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*. 2004 Nov;64(5):600-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

免疫によって認識される重症急性呼吸器症候群コロナウイルス由来ペプチド、特願 2004-044873 (2004.8.18)

分担研究報告書

中国との研究調整

分担研究者 笹月 健彦 国立国際医療センター総長

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、ヒト型ウシを用いた SARS ウイルス中和ヒト型抗体の開発を行うことである。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共同研究を組織した。日中共同研究によるサル SARS ウイルス感染実験に関する共同研究契約の締結を進めている。

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、分担研究者らと中国の専門家が日中 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共同

研究契約を締結できる段階になってきた。

B. 研究方法

笹月は、「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 日で、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。

これらの話し合いを基に、日本の共同研究者のである切替照雄（国立国際医療センター）や石田功（キリン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た。

C. 研究結果

中国とのサル 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のための出張内容をまとめる。

出張件名：中国との SARS に関する共同研究打ち合わせ

出張期間：平成 15 年 3 月 21～24 日

出張者名：

切替 照雄(国立国際医療センター研究所部長)

石坂 幸人(国立国際医療センター研究所部長)

秋山 徹(国立国際医療センター研究室長)

趙 吉子(ヒューマンサイエンス財団リサーチレジデント)

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)

出張目的：SARS 治療法の開発研究における中国との共同研究を推進するため、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を訪問し、共同研究のための打ち合わせと研究施設視察を行った。

活動内容：

SARS サル感染実験の可能性に関する研究打ち合わせ

中国医学科学院実験動物研究所長 Dr. Chuan Qin らとの会談で、共同研究として SARS サル感染実験を実施できる可能性があることが分かった。

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、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。1994 年から、P3 感染実験を実施しており、SARS も含めてこれまでに実験室内での人への感染事故はない。P3 感染実験室は 3 室あり、サルなどの大動物 2 実験室、マウスなどの小動物 1 実験室からなっている。通常は、SARS の他に、結核や HIV の感染実験も実施している。大動物用の実験室は、通常 1 実験室あたり 100 匹規模の実験が可能であるが、SARS の実験では、1 実験室あたり 30～32 頭の実験が実施可能である。なお、感染実験では、それぞれのケージが独立した空調システムで管理されている (IVC: isolated ventilation cage)。

SARS 感染実験では、リーサスサル、カニクイサル、マーモセットザルを用いた SARS 感染実験を試

みたが、SARS 感染モデルとしては、リーサスサル (3-4kg) が適当である。

その他 SARS 関連の研究として、ACE2 ノックアウトマウス及び ACE2 トランスジェニックマウスを作成している。また、新薬の安全性試験も実施していた。

具体的な共同研究を始めるために、以下のような議論をした。

- ✓ 日本との共同研究を始める前には、共同研究契約を結ぶ必要がある。まず、原案を日本側が作成する。
- ✓ 研究打ち合わせのために Dr. Chuan Qin を日本に招請する。
- ✓ 実験に必要な経費は、日本側が負担する。
- ✓ 日本側は、最適化した SARS コロナウイルス抗原を免役したヒト型マウス (50-100 頭) から得られたヒト IgG (5-20mg) を 2005 年末までに準備する。
- ✓ 中国医学科学院実験動物研究所は、リーサスサル (1 頭 15 万円) 10 頭の規模でヒト IgG の SARS 感染防止効果を判定する。
- ✓ SARS コロナウイルスゲノム cDNA を日本に供給できる。その場合は、MTA を締結する必要がある。
- ✓ 将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

SARS コロナウイルス由来タンパク質の結晶解析に関する研究打ち合わせ

中国科学院生物物理研究所長 Dr. Zihe Rao らとの会談で、ヒューマンサイエンス海外委託研究事業「SARS コロナウイルスおよび新型鳥インフルエンザ由来蛋白質の構造解析に関する研究」に関する報告及びその他の共同研究の可能性に関して議論した。

中国科学院生物物理研究所では、SARS コロナウイルス由来蛋白質の構造解析に関する研究が進んでいるので、この分野に研究費を有効に使用し、成果を報告することを公約した。

中国科学院生物物理研究所では、SARS コロナウイルスの非構造タンパク質の精製が進んでいた。そこで、これらに対するヒト型抗体の作成と生物活性の解析に関する共同研究の提案が双方からなされた。まず、これらに関する共同研究契約を作成する必要があることが指摘された。

SARS 患者ゲノム解析について

中国医学科学院 中国協和医科大学、Dr.

Taisheng Li 博士に面会し、研究契約を締結した。内容は SARS 患者 50 名の ACE 遺伝子の解析を行うとのことであった。

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った。中国医学科学院実験動物研究所共同研究として SARS サル感染実験を実施できる可能性があることが分かった。

また、将来、中国医学科学院実験動物研究所は、本共同研究に関して、新薬等の安全性試験を実施することが可能である。

E. 結論

SARS コロナウイルス由来タンパク質の構造解析及び SARS 患者ゲノム解析の 2 つの共同研究が始まった。また、中国医学科学院実験動物研究所長らとの共同研究として、SARS サル感染実験を実施できる可能性があることが分かった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 原著論文

Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C., Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T. : Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus

recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

Itoyama, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C., Long T-H., Ha, L-D., Ban, V.-V., Hu, C.-J., Ohashi, J., Hijikata, M., Matsushita, I., Kawana, A., Yanai, H., Kirikae, T., Kuratsuji, T. Sasazuki, T. : ACE1 polymorphism and progression of SARS. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 323: 1124-1129, 2004.

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. Biophysic. Res. Commun.*, 329: 1234-1239, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

免疫によって認識される重症急性呼吸器症候群コロナウイルス由来ペプチド、特願 2004-044873 (2004. 8. 18)

研究要旨

SARS ウイルス中和抗体エピトープを同定する目的で、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エピトープの同定を試みた。抗原結合蛍光ビーズを用いたフローメトリーにより、少量の血清で迅速かつ安全に測定できる方法を確立した。この方法を用いて、SARS ウイルスの構造タンパク由来 15 残基のアミノ酸からなる 5 残基オーバーラップペプチド 197 種類を3名の急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42 種類のペプチドが陽性であった。これらのペプチドのうち、健常人・非 SARS 感染患者血清に比べて感染6ヶ月後に採血した患者(45 名)血清で認識されるペプチドを3種類 (S791, M207, N161) 同定した。各種 SARS ウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。本研究で同定したエピトープはSARS中和抗体の開発のための有力な抗原エピトープである。

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。

本研究では、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、表面抗原である spike protein 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た。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試みた。最終的には、これらエピトープを含むオリゴペプチドをヒト型マウスに免疫し、それらに対する SARS ウイルス中和抗体を開発する。

B. 研究方法

1. 抗原ペプチドの候補選定

SARS-CoV ゲノムに存在する 14 個の ORF のうち、ウイルス粒子表面に存在すると考えられる spike 蛋白質、membrane 蛋白質、および以前に他のコロナウイルスで中和抗体誘導抗原となることが報告されている nucleocapsid 蛋白質、の 3 つの蛋白質を抗原候補として選択した。これらについて、197 種類の重なり合うように設計された 15mer のペプチドを合成し、感染後 6 ヶ月のベトナム SARS 患者 78 名から採取した血清中の IgG との反応性を検証して、抗原ペプチド候補を絞りこんだ。

2. 抗原ペプチドのデザイン

選定された SARS 患者に特異的な 3 つのペプチド (S791: PLKPTKRSFIEDLLF, N161 QLPQGTTLPKGFYAE, M207 TDHAGSNDNIALLVQ) の配列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

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・1 を、ペプチドを結合させた color-coded beads 25・1 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・1 streptavidin-PE と室温で 30 分間反応させた後 3 回洗浄し、100・1 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 (P 3 相当) 内で行った。N 9 5 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(2 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。

(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 ウイルスの構造タンパク由来 15 残基のアミノ酸からなる 5 残基オーバーラップペプチド 197 種

類を 3 名の急性期感染患者血清でスクリーニングしたところ、42 種類のペプチドが陽性であった。Nucleocapsid (N) が 15、spike (S) が 20、および membrane (M) が 7 種類で、envelope (E) の陽性ペプチドはなかった。以上の結果は、nucleocapsid (N) および spike (S) の免疫原性が強いことが示唆され、他の報告とも一致した。なかでも、spike タンパク質の 791-805 番目のアミノ酸からなるペプチド (S791) が最も高い測定値を示した。同様に nucleocapsid の 161-175 番目のアミノ酸からなるペプチド (N161) も高値を示した。

これら 42 種類のペプチドのうち、健康人および接触非感染者血清に比べて感染 6 ヶ月後に採血した患者 (45 名) 血清で有意 (Student' s t-test および Mann-Whitney test) に認識されるペプチドを 3 種類 (S791, M207, N161) 同定した。

これら 3 種類のペプチドに対する抗体を健康人の測定値から求めたカットオフ値で陽性割合を算出したところ、抗 S791 が患者、接触非感染者、および健康人に対してそれぞれ 51%、7.8%、および 8% であった。同様に、抗 M207 に対して、それぞれ 60%、4.3%、および 6% で、抗 N161 に対して、それぞれ 42%、9.1%、および 4% であった。

他の感染症や自己免疫疾患における血清中抗体の交差反応性を調べる目的で日本人 C 型肝炎 (12 名)、インフルエンザ (12 名)、リュウマチ (15 名)、SLE (10 名)、および日本人健康人 (27 名) で調べたところ、先の 3 種類のペプチドに対する交差反応は認められなかった。

抗原ペプチドに対する抗体の特異性を確認する目的で、固相化したペプチドでの吸収実験を行った。対応するペプチドで特異的に吸収され、それ以外の用いたペプチドでは吸収されなかったことから、感染者血清中で検出された 3 種類のペプチドに対する抗体は抗原特異的であることが示唆された。

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。従って、タンパク質抗原を用いた ELISA で抗体を測定すると、交差反応性抗体が検出される可能性がある。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。一方、SLE 患者血清でも、SARS-CoV 由来のタンパク抗原を用いた ELISA で測定すると交差反応が認められることが報告 (Wang et al, 2003) されている。オーバーラップペプチドに対する抗体の測定でも、SLE 患者血清で交差反応するペプチドが検出され、自己抗原に対する抗体が SARS-CoV 由来ペプチドと交差反応することが示唆された。これらのことから、健常人血清、各種感染症、自己免疫疾患などの患者血清中抗体が交差反応しない特定のペプチド抗原を選別し、診断用ペプチドを決定する。即ち本研究で同定した 3 種類のペプチドを用いた抗体の測定は特異性を確保する意味からも有用であることが示唆された。

タンパク質抗原には通常 MHC クラス II 分子に結合できる複数のペプチド配列が存在するため、CD4 T 細胞に働くタンパク質抗原のほとんどは T_H1 細胞と T_H2 細胞のいずれをも誘導する。このうち、あるペプチドは MHC クラス II 分子に高い親和性をもって結合し、その結果、抗原提示細胞表面に高い濃度で提示されるが、あるものは弱い親和性しか持たず、従って抗原提示細胞上には低い濃度でしか提示されない。従って MHC 分子に対して高い親和性を持つペプチドに特異的なナイーブ T 細胞は、高濃度のリガンドと出会いやすく、一方親和性の低いペプチドに特異的な T 細胞は低濃度のリガンドにだけしか出会わないこととなり、このことはその後の T 細胞の反

応様式に大きな影響を与えることとなる (Constant SL and Bottomly K, Induction of T_H1 and T_H2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu. Rev. Immunol., 1997, 15: 297-322)。実際、一つの抗原内で一つのペプチドが T_H1 細胞を、別のペプチドが T_H2 細胞を誘導する例があることが、ある特定の抗原において実験的に示されている。このような観点から、各エピトープに対する免疫応答と個々の感染者での予後の良否、血中ウイルス量の違い、などとの関連性の今後の解析が待たれる。

Nucleocapsid (N) は、抗原性が高い SARS ウイルス由来のタンパク質であるが、このタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた antigen capture ELISA を Diら (Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12, 135-40) は開発し、発症後における抗体の出現を経時的に解析した。発症後 1-5、6-10、11-15、および 16-20 日で、陽性率はそれぞれ 92.9、69.8、36.4、および 21.1% と、急性期で最も高くその後次第に減少することが明らかにされた。本研究で同定された 3 種類のペプチドに対する抗体は、6 ヶ月後で S791, M207, および N161 に対してそれぞれ 51%、60% および 42% といずれも高い陽性率を示していることからペプチドに対する抗体測定の有用性が示唆された。

E. 結論

各種 SARS ウイルス由来エピトープに対する免疫応答が、個々の患者により異なったり、感染後の経時的な応答が異なったりすることから、各エピトープに対する抗体を測定することが患者の予後との関連などを解析する上で重要な情報を与えるものと考えられた。本研究で同定した長期持続免疫抗体が認識するエピトープは、SARS 中和抗体の開発のための有力な抗原エピトープである。

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 (英文査読誌掲載論文)

Shichijo, S., Keicho, N., Long H.T., Quy, T., Phi, N.-C., Ha, L. D., Ban, V.-V. Itoyama, S., Hu, C.-J., Komatsu, N., Kirikae, T., Kirikae, F., Shirasawa, S., Kaji, M., Fukuda, T., Sata, M., Kuratsuji, T., Itoh, K., Sasazuki, T.: Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens*, 64: 600-607, 2004.

Itoyama, S., Keicho, N., Quy, T., Phi, N.C., Long, H.T., Ha, L.D., Ban, V.V., Ohashi, J., Hijikata, M., Matsushita, I., Kawana, A., Yanai, H., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: ACE1 polymorphism and progression of SARS.

Biochem Biophys Res Commun., 323: 1124-1129, 2004.

Emi Hamano, Minako Hijikata, Satoru Itoyama, Quy Tran, Phi Chi Nguyen, Long Thuy Hoang, Ha Dang Le, Ban Van Vo, Ikumi Matsushita, Hideki Yanai, Fumiko Kirikae, Teruo Kirika, Tadatoshi Kuratsuji, Takehiko Sasazuki: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA Associated with SARS in the Vietnamese population. *BBRC*, 329: 1234-1239.

Nishiura H, Kuratsuji T, Quy T, Phy NG, BanVV, Ha Le D, Long HT, Keicho N, Kirikae T,

Sasazuki T, Anderson RM. Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam *Amer J. Trop Med Hygiene* 2005 in press.

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)

なし

1-4. 論文発表 (著書)

なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表 (口頭・ポスター発表)

なし

2-2. 国内学会発表 (口頭・ポスター発表)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

免疫によって認識される重症急性呼吸器症候群
コロナウイルス由来ペプチド、特願 2004-044873
(2004. 8. 18)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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。本年度は同抗体の中和活性検定に必須となる SARS-CoV 中和試験の試験法を確立した。

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 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の確立を試みた。

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。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、測定系を確立する。

C. 研究結果

以下に今回、確立した中和試験法を示す。

- 1) 96 ウエルマイクロプレートに VeroE6 細胞が単層になるように細胞増殖培地で培養する。
- 2) 細胞維持培地を用いて 100TCID₅₀/50ml のウイルス液を作成する。
- 3) 上記のウイルス液 200ml と細胞維持培地で 10 倍から 2 倍階段希釈された被検血清 200ml を混合し、37°C で 1 時間反応させる。対象として、SARS 抗体陰性ヒト血清を用いる。
- 4) 96 ウエルプレートの培養液を除き、中和反応後の各希釈段階におけるウイルス液 100ml を 4 つのウエルにそれぞれ加える。37°C で 3 日間培養後、各ウエルの CPE の有無を倒立顕微鏡を用いて観察する。
- 5) ウイルス液を被検血清と中和させることによ

り CPE が抑えられている場合には中和抗体陽性と判定し、2 ウェル以上で CPE 出現が抑制された最高希釈倍率の逆数を中和抗体価とする。

6) 尚、プレートに培養されている細胞をホルマリン固定後、クリスタルバイオレット液で染色すると、CPE の判定が容易になる場合があり、さらにプレートを保存できる。

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。これまでに、検体の種類によっては、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 VeroE6 細胞に SARS-Corona ウイルス (moi of >1.0) を感染時には一旦 CPE が出現し始めると、その進行は比較的早いこと、を経験している。また海外の研究では、SARS-CoV 検体接種後 3-6 日目頃には細胞の円形化、一部脱落などの CPE が観察され、その上清を新しい細胞に継代すると比較的速やかに (24-48 時間) CPE が出現し、48 時間ごろまでには大部分の細胞が剥がれ落ちるという観察結果が報告されている。組換えウイルスなどを用いたより安全で、試験実施に関わるリスクの少ないウイルス中和試験法の確立が別途必要と考えられ、現在検討中である。

E. 結論

本年度の目標であった SARS-CoV に対するヒト型抗体のウイルス中和活性検定の方法を確立することができた。次年度は作成されるであろう同抗体の中和活性測定を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. B. L. Haagmans, T. Kuiken, B.E. Martina, R. A. M. Fouchier, G.F. Remmelzwaan, G.V.Amerongen, D. V. Rhiel, T. de Jong, S. Itamura, K.-H. Chan, M. Tashiro, A.D.M.E. Osterhaus Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature Med.* 10: 1-4, 2004
2. L. L. M Poon, C. S. W Leunga, M. Tashiro, K. H. Chan, B. W. Y. Wong, K. Y. Yuen, Y. Guan, J. S. M. Peiris. Rapid Detection of SARS Coronavirus by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Clin. Chem.* 50:1050-1052, 2004
3. Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. :A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int. Immunol.* 16:1423-1439, 2004
4. Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Notomi, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Matsuyama, S., Long, H.-T., Hanh, G. T.-H., Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods* in press 2005
5. Okada, M., Takemoto, Y, Okuno, Y., Hashimoto, S., Yoshika, S., Fukunaga, Y., Tanaka, T., Kita, Y., Kuwayama S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Takai, H., Okada, C., Sakaguchi,