

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究
平成 16 年度～18 年度 総合研究報告書

研究報告書

主任研究者 田口文広

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書	
SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究（田口文広）	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧	15
III. 研究成果の刊行物・別冊（抜粋）	21

総括研究報告書

SARS コロナウイルスに対するワクチン開発に関する研究

主任研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第三部）

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は新型コロナウイルス（SARS-CoV）によって引き起こされる新興感染症である。本研究は、SARS ワクチン、抗ウイルス剤開発のための包括的研究を行うものである。本研究により以下の成果が得られた。（１）重症化機構に関する研究：培養細胞での SARS-CoV 増殖はプロテアーゼにより著しく亢進することが明らかにされ、プロテアーゼによる感染増強が重症化に関与している可能性が示唆された。そこで、弱病原性細菌パスツレラ菌（Pp）の経鼻感染により微弱肺炎を誘導し SARS-CoV を感染させると、増殖は著しく亢進し、ヒト SARS と同様の重症肺炎を引き起こすことが明らかにされた。Pp の感染によりマウス肺中ではエラスターゼが産生され、ウイルス増殖亢進に関与していると思われた。本研究により、弱毒細菌との混合感染による SARS 動物病態モデルが樹立された。（２）ワクチン開発に関する研究：精製ウイルス粒子を用いた UV 照射 SARS-CoV はマウスで中和抗体や T 細胞応答を誘導し、より安全性を高めた UV 照射 + formalin 処理 SARS-CoV の皮下接種でも同様の効果がえられた。両ワクチンを上記 SARS 病態モデルマウスで検討したところ、共に強い感染防御能を賦与することができた。SARS-CoV 各遺伝子を持つ組換えワクシニアウイルス DIIs を作成した。これらの組換えウイルスはマウスで液性、細胞性免疫及び粘膜免疫を誘導した。また、SARS-CoV スパイク（S）遺伝子を持つ DIIs は、マウスで中和抗体の産生を誘導し、マウス SARS 病態モデルにおいて、SARS に対する高い抵抗性を誘導した。SARS-CoV 遺伝子 cDNA を持つ発現ベクターを用いて、DNA ワクチンを開発した。SARS-CoV S 遺伝子 cDNA を持つ発現ベクターはマウスで中和抗体産生を誘導し、N、M 遺伝子を持つベクターは強力な T 細胞活性化を誘導した。また、SCID-PBL/hu を用い、SARS-CoV 増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導するワクチンを作製した。SARS-CoV 遺伝子 cDNA を持つ発現ベクターは、ヒトリンパ球を持つ SCID-PBL/hu マウスの系で、液性、細胞性免疫反応を誘導した。（３）抗ウイルス剤開発に関する研究：既に認可されている薬剤や SARS-CoV が持つプロテアーゼの阻害剤を *in silico* screening で検索して、高い抗 SARS-CoV 活性を示す薬剤が発見された。これらの薬剤は、マウス感染系でもウイルス増殖抑制効果が見られた。S 蛋白を宿主細胞に強制発現し、発現された分子に対する抗体をヒト抗体ライブラリーから効率的に単離するシステム開発を実施した。（４）SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：各種動物の SARS-CoV 受容体アンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）の分子系統解析から、SARS-CoV に感受性を示す動物の ACE2 は 4 群に分類された。SARS に高い感受性を示すフェレット、ネコの ACE は高い受容体活性を持つことが明らかにされた。伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）感染では、抗 S 抗体による感染増強（ADE）が観察され、その機構はウイルス抗体複合体が Fc レセプ

ター (FcR) を介して細胞に侵入することによる。本研究では、1) ADE にはウイルス受容体は関与せず、同じ血清型の FIPV の再感染で誘導されること、2) FIP の病態形成には TNF α による T リンパ球のアポトーシスが関与し、マクロファージ (M Φ) からの TNF α の産生は ADE によって増強されること、3) ADE により産生が増加した TNF α は M Φ に作用しウイルス受容体のアミノペプチダーゼ N (APN) の発現上昇を促すことを明らかにした。豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) とその宿主受容体ブタ APN (pAPN)の相互作用を解析するため、pAPN 発現細胞株を樹立した。樹立細胞を用いて、TGEV とその変異株で組織親和性及び病原性の異なる豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) の感染を比較検討した。TGEV と PRCV は共に pAPN を受容体として細胞侵入するが、TGEV の方が PRCV より増殖が高かった。ウイルス感染細胞内の蛋白解析から、M (membrane) 蛋白の産生量の違いがその原因であることが示唆された。

分担研究者

横田 恭子 (国立感染症研究所免疫部)
岡田 全司 (国立病院機構近畿中央胸部疾患センター)
石井 孝司 (国立感染症研究所ウイルス第二部)
黒澤 和良 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)
山本 典生 (東京医科歯科大学医学部)
山田 靖子 (国立感染症研究所動物管理室)
宝達 勉 (北里大学獣医畜産学部)
池田 秀利 (動物衛生研究所感染病研究部)

A. 研究目的

本研究班の主要な目的は、致死率の極めて高い新興感染症である SARS に対する有効で安全性の高いワクチン及び抗ウイルス剤を開発することである。この目的を達成するために、SARS-CoV に関する包括的な研究を以下の4点に焦点を当てて行う。

1) SARS の重症化機構の解明、2) 不活化 SARS-CoV、組み換えワクシニアウイルスや SARS-CoV 遺伝子を持つ組み換え DNA による有効なワクチンの開発及びその基礎的な研究、3) 抗ウイルス剤の開発、及び4) ワクチンの有効性を評価する動物モデルの作成及び SARS-CoV のワクチン開発モデルとしての他の動物コロナウイルス研究である。

1) SARS の重症化機構の解明では、プロ

テアーゼによる SARS-CoV の増殖亢進、弱毒呼吸器細菌パストレラ菌によるマウス肺中でのプロテアーゼ誘導及びパストレラ菌との混合感染によるマウスの重症化肺炎の誘導を目的とし、最終的には SARS 動物病態モデル系を確立したい。

2) SARS-CoV に対する不活化ワクチンに関する研究では、UV 不活化及び UV+ホルマリン不活化 SARS-CoV による液性、細胞性免疫の誘導能を検討し、SARS に有効なワクチン開発を目指す。組換えワクシニアウイルスを用いたワクチン開発では、SARS-CoV の spike (S), envelope (E), membrane (M), nucleocapsid (N) 遺伝子を持つ組み換えベクターを作成し、マウスを用いて、抗 SARS 免疫能誘導について検討し、SARS に有効な組み換えワクチンの確立するのが目標である。DNA ワクチン研究では、SARS-CoV S, M, N 遺伝子を持つ発現ベクターをマウスに投与して、その免疫賦与活性について検討し、ヒトで応用可能な DNA ワクチンを開発する。

3) SARS-CoV に対する抗ウイルス剤開発では、既に認可された薬剤及び SARS-CoV プロテアーゼを標的とした薬剤等の開発を行なう。動物実験でその有用性について検討し、ヒトで応用可能な抗ウイルス剤の開発を目指す。また、治療用抗体として、抗体ライブラリーを用いて、SARS-CoV に対して中和活性の高い抗体を得る。

4) 動物モデルの作成に関しては、SARS-CoV に極めて感受性が高く、重篤な症状を示すことが報告されているフェレットやネコの ACE2 の SARS-CoV 受容体活性を検討する。また、動物コロナウイルス研究としては、FIPV の抗体依存性感染増強 (ADE) が SARS でも危惧されている背景から、FIPV の ADE 機構の解明や感染後に起こる leukopenia の発症機序について解明する。SARS-CoV の変異に関する相同研究として、S 遺伝子の変異と病原性の解析が進んでいる TGEV 研究を行なう。TGEV S 遺伝子変異体である PRCV との組織親和性や病原性の違いについて解明する。

B. 研究方法

本研究班では香港で分離された SARS-CoV 株 HKU39849 及びドイツ Ziebuhr 博士から分与された SARS-CoV Frankfurt-1 株 (Fr-1) とこれらから分離された S, M, E 及び N 遺伝子を用いた。

1) 重症化機構に関する研究: SARS-CoV の VeroE6 細胞での増殖に各種プロテアーゼがどの様に影響を与えるかを、ウイルスの感染性、S 蛋白の開裂性、リアルタイム PCR を用いた SARS-CoV mRNA 合成量により調べた。また動物実験では、6 週令雄 BALB/c に *Pasteurella pneumotropica* (Pp) MaM 株 (6×10^6 cfu) を経鼻感染させ、その一日後 Fr-1 株又は Fr-1 株のマウス馴化株 (Fr-mo) を約 1×10^6 PFU を経鼻接種した。感染後のマウス体重とマウス体内でのウイルス増殖を調べた。ウイルス増殖は感染後マウスから肺やその他の主要臓器を採取し、10% 乳剤を作成し、ウイルス感染価を VeroE6 細胞によるプラーク法か TCID₅₀ 方で定量した。また、採取した組織の一部については、組織病理学的検索も行なった。

2) ワクチン開発に関する研究: 不活化ウイルスは SARS-CoV 感染 VeroE6 細胞の培養上清を糖密度勾配で超遠心により精製した粒子を用いた。これを UV で照射し

たものを不活化 SARS-CoV (UV-V) として用いた。ホルマリン処理は、UV 不活化ウイルスに最終濃度 0.02% フォルマリンを添加し、室温で 1 晩放置した (UV-FV)。マウスの免疫には、不活化粒子を皮下にアラムアジュバント有り無しで投与した。7 週間後同じ免疫を繰り返した。その後 7 日目にマウスの脾臓および所属リンパ節を採取して T 細胞機能を解析した。また、これらのマウスの血清を経時的に採取して血中抗体価を測定した。不活化ワクチンの防御効果は以下の方法によった。UV-V、UV-FV ($10 \mu\text{g}/\text{head}$) をアジュバントとともにマウスの皮下に免疫した。4 週間後ブスター免疫し、9 日目に Pp を感染させ、翌日 F-mo 株: を経鼻接種した。その後は、上述のように体重変化、血清、鼻洗浄液、肺洗浄液のウイルス価を測定した。組換えワクシニアウイルス DIs 作製は常法に従って、S, M, N, E 全遺伝子を含むウイルス及び各々の単一遺伝子を含むウイルスを作成した。これらの組換え DIs を CEF に感染させ、目的蛋白の発現をウエスタンブロット法および免疫蛍光抗体染色法で確認した。これらの組換えウイルスをマウスに皮下あるいは経鼻接種し、SARS-CoV 構造蛋白に対する液性、細胞性および粘膜免疫の誘導能を検討した。また、病態モデルに対するワクチン効果を上述の不活化ワクチン実験プロトコールと同様に行なった。

SARS-CoV の S, M, N, E の各ウイルス構造タンパク cDNA を持つ発現ベクターを構築した。発現蛋白を選別する目的で His tag 利用し、真核細胞と大腸菌に S, M, N, E の各 cDNA を導入して蛋白を発現させた。これらをヒト免疫グロブリン染色体導入マウス (KM マウス) に免疫した。BALB/c、C57BL/6 マウスに S, M, N, E DNA ワクチンを筋肉注射し、血清中の抗体価を SARS DNA を導入した Cos 細胞に対する抗体結合反応と Vero 細胞を用いた感染中和抗体活性で測定した。中和試験は 96 穴 plate に撒いた Vero-E6 細胞を

用いて、常法に従い行った。細胞性免疫（キラーT細胞）活性は以下の方法によった。マウスⅡ型肺胞上皮 cell line に S、M、N DNA を導入し、これを抗原として用い、IFN- γ 産生によるキラーT 活性を測定した。ヒト免疫応答解析モデル（SCID-PBL/hu）は、IL-2 レセプター γ 鎖ノックアウト NOD-SCID マウスに健常人 PBL を投与し、作製した。これに DNA ワクチンを注射しヒト中和抗体価を測定した。SCID-PBL/hu を用いた抗原に対するヒト・キラーT 細胞の誘導は SARS 蛋白-パルス自己 B プラスト cell を標的細胞として用いた。さらに、SCID-PBL/hu の系を用いて、SARS(M)DNA ワクチン又は SARS(N)DNA ワクチンを 1 週毎に 3 回筋肉注射（100mg DNA）した。最終免疫より 1 週後に spleen cell を投与し、effector 細胞とした。SARS(M)DNA 又は SARS(N)DNA を自己のヒト PBL プラスト（PWM でプラスト化）に導入した細胞を標的細胞とし、⁵¹Cr release 法でアッセイした。

3) 抗ウイルス剤開発に関する研究：様々な観点から抗ウイルス剤の候補物質を収集し、それらの抗ウイルス活性を SARS-CoV の感染系において評価した。収集した化合物セットは、(1)すでに市販されヒトに用いられている抗ウイルス剤、(2) in silico screening によって選択された化合物、(3) スタキフリン誘導體、(4)ポリオキソメタレート群の 4 セットを用いた。それらの抗ウイルス活性の評価は、FFM-1 株を Vero E6 cell に感染させる系に MTT assay、リアルタイム RT-PCR 等を適用して行った。In vivo アッセイは BALB/c マウスに Fr-1 を感染させる系を使用した。感染後 3 日目で材料を採取し、リアルタイム RT-PCR 等によってウイルスの定量を行った。ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングして中和抗体を得るために、SARS-S タンパク質を利用する。スクリーニングに用いる SARS-S タンパク質は、なるべくナチュラルに近い構造を取っていることが

望ましい。この目的に最も合致する抗原としては、不活化した SARS-CoV ワクチンが考えられるが、入手が困難である。そこで、SARS-S タンパク質の ectodomain を動物細胞あるいは昆虫細胞を用いて分泌、発現、精製する方法、SARS-S タンパク質を細胞膜上に大量に強制発現させた動物細胞あるいは昆虫細胞を用いる方法が考えられる。これらの方法で抗原が得られれば、これを用いてファージ抗体ライブラリーをスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離する。本研究においては、ファージ抗体ライブラリーとして、AIMS5 および ANYmix (A, N, Y ライブラリーを混合したもの) を用いることにした。

4) SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：各種動物の ACE2 塩基配列の決定はネコ、フェレット、ハムスター、スナネズミ、ハクビシン、アライグマおよびアフリカミドリザルからの mRNA を鋳型に RT-PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスにより決定した。また、ヒト、ネコ、フェレット、マウスの ACE2 発現 HeLa 細胞を作製した。各動物の ACE2-HeLa に SARS-CoV Fr-1 株を moi=0.1 で接種し、48 時間後の培養中のウイルス力価を、VeroE6 を用いたプラークアッセイで求めた。また、SARS-CoV S を持つ VSV シールドタイプウイルスを用いて、各動物 ACE2 発現細胞への感染性を検討した。

猫コロナウイルスは、致死性の FIP の原因ウイルス FIPV であり、S 蛋白質に対する抗体により感染が増強 (ADE) される。この ADE は、ウイルス抗体複合体が FcR を介して細胞に侵入することによって起こる。また、FIP 発症猫ではアポトーシスによる T リンパ球の減少が著しい。FIPV は、M Φ を標的細胞の 1 つとしているが、この M Φ での増殖が病原性発現に重要と考えられている。しかし、ADE 発現時のウイルス侵入機構や ADE 発現と病態形成との関連など未だ不明な点が多い。そこで本研究では、1) ADE 発現におけるウイルスレセ

プターの関与および ADE 発現と血清型の関係を明らかにする、2) FIP 発症猫で見られる lymphopenia の原因を明らかにすると共に、ADE 発現と lymphopenia の関係を調べる、3) ADE 発現と FIP 重症化の関係を明らかにすることを目的に実験を実施した。

TGEV pAPN の発現には pAPN-FLAG 導入した発現ベクター (pAPN-FLAG/pCAGGS) を用い、恒常的発現細胞は、NIH3T3 細胞に pAPN-FLAG/pCAGGS を導入することにより作成した。pAPN-FLAG 発現は、抗 FLAG 抗体を用い IFA、WB 法、フローサイトメトリー法によった。pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞株の TGEV および PRCV に対する感受性は以下の様に行なった。各細胞に moi=0.01 で TGEV To163 株または PRCV CH45 株を接種後経時的にアセトン固定し抗 TGEV 兎血清を用いウイルス抗原を検出した。また同様に培養上清と培養細胞中のウイルス感染力価を経時的に測定した。ウイルス RNA 合成効率、感染細胞より RNA を抽出し cDNA を作製、S、M および N 遺伝子の subgenomic mRNA、genomic RNA を RT-PCR により検出した。各ウイルス構造蛋白も感染細胞から経時的に細胞溶解液を回収し、各ウイルス構造蛋白の産生性を抗 TGEV 兎血清を用いたウエスタンブロットティングにより観察した。

C. 研究成果

1) 重症化機構に関する研究：VeroE6 細胞を用いた SARS-CoV 感染は、トリプシンなどの存在下では感染が著しく亢進することが明らかにされた。ウイルス増殖亢進効果は、肺炎時に産生されるエラスターゼについても認められた。これらのことから、SARS-CoV の肺炎重傷化には肺で産生される炎症性プロテアーゼが大きく関与していることが示唆された。そこで、上記仮説について検討した。我々は、マウスに軽度の呼吸器炎症を引き起こす細菌、パスツレラ菌 (Pp) と肺炎球菌 (Sp) の感染が

SARS-CoV の肺での増殖を増強する可能性について検討した。マウスに Pp, Sp を経鼻感染させ 1 日後に SARS-CoV を経鼻感染させた。Pp 感染マウスは感染後 1 日～3 日に軽度の体重減少を示し、逆毛が見られたが、Sp, SARS-CoV の単独感染では、そのような変化は認められなかった。3 日目の肺に於けるウイルス力価を比較すると、SARS-CoV 単独感染と比べ pp 混合感染では、約 100 倍高い価を示したが、sp 感染では単独感染と同様のウイルス価であった。即ち、SARS-CoV の肺での増殖は Pp との混合感染で著しく増強されたが、マウスに重症肺炎を誘導することは出来なかった。そこで、マウス馴化 SARS-CoV と Pp との混合感染を検討した。その結果、マウスは感染後 4-6 日に重症肺炎に陥り、著しい体重減少を示し、40-90% が死亡した。病理学的検索から、マウスの肺炎はヒト SARS の肺炎像と酷似する diffuse alveolar damage を呈していた。本研究により、肺で産生されるプロテアーゼの重症化肺炎誘導の重要性が示唆され、マウスを用いた SARS 病態モデルが樹立された。

2) ワクチン開発に関する研究：UV(UV-V) または UV/form 不活化 SARS-CoV(UV-FV) をアラム有り無しで皮下に接種し、2 回のブースター免疫後 1 週目の血中の IgG 抗体価を比較した。アラム無しの UV-FV ワクチンの効果は若干弱いものの、ブースター後には UV-F とほぼ同等の効果であった。アラム添加では、両者の免疫効果は有意な差がなく、どちらの群でも中和抗体が誘導されていた。一方、血中抗体をサブクラスでは、IgG2a 抗体はアラム有無にかかわらず UV-FV 接種群でかなり低値を示した。これら不活化ワクチンの T 細胞に対する効果を解析するため、リンパ節からの T 細胞のサイトカイン産生量を測定した。IL-2 は virion 添加有り無しに関わらず誘導されたが、IFN- γ 、IL-4、IL-5 の産生は virion 添加によってより高まった。UV-V と UV-

FV の感染防御効果をマウス SARS 病態モデルで検討した。UV-V、UV-FV とアラム、対照としてアラムのみを 2 回接種したマウスに Pp+SARS-CoV を感染させた。対照群のマウスは体重減少、呼吸器症状を呈して感染後 7 日での致死率が 90%以上であったが、ワクチン接種群では感染 2 日後から体重、臨床症状の回復が見られ、感染後 7 日で殆どマウスが生存していた。ワクチン接種群のマウスでは非接種群マウスと比べ、ウイルス感染が殆どなく、いずれの不活化ウイルスを使用しても、高い感染防御効果が認められた。

組み換えワクシニアウイルスを用いた研究では、9 種の組換え DIs を作製し、哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が効率よく発現されることを確認した。組換え DIs を経鼻あるいは皮下接種されたマウスは SARS-CoV を認識する抗体が誘導され、細胞性および粘膜免疫も同様に誘導されていた。S を発現するウイルス接種群の血清は、SARS-CoV 中和活性を示した。E/M/S あるいは E/M/N/S を発現する組換え DIs を経鼻あるいは皮下接種された群は、SARS-CoV の経鼻感染から完全に防御された。一方、N 発現組換え DIs 接種群は SARS-CoV に対する強い抗体価が誘導されたが、SARS-CoV 感染を防御することはできなかった。また、Pp と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎モデルを用いて、組換え DIs の接種によるワクチン効果を検討した。組換え DIs 皮下接種群は全例が生存したのに対し、コントロール接種群では 5 日で約 80%が死亡した。体重減少でも組換え DIs 接種群には明らかなワクチン効果が認められた。組換え DIs 接種群では鼻腔及び肺洗浄液から SARS-CoV は全く検出されなかった。また、ワクチン接種群とコントロール群で IL-6、MCP-1 量に大きな差が認められた。SARS-CoV の S、M、E、N 蛋白を大腸菌及び培養細胞で発現するベクターを作成した。マウスに S、M、N、E DNA ワクチンを筋肉注射すると SARS-CoV に対する中

和抗体産生を誘導した。SARS(M) DNA ワクチンは SARS ウイルス感染 Vero 細胞に対し、ヒト中和活性及び SARS ウイルス増殖阻止活性を示した。SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンが SARS に対するヒト T 細胞免疫（増殖反応と IFN- γ 産生）を増強することが明らかとなった。また、SARS(N)DNA ワクチンで免疫した SCID-PBL/hu より SARS N 蛋白に対して特異的・特異的なヒト・キラー T 細胞が誘導された。一方、SARS (M) DNA ワクチンで免疫した SCID-PBL/hu から SARS M 蛋白に特異的なヒト・キラー T 細胞が誘導された。これらのヒト・キラー T 細胞はヒト CD3⁺・CD8 陽性 T 細胞であった。

3) 抗ウイルス剤開発に関する研究：ヒトで広く使われている HIV protease 阻害剤 nelfinavir が、リアルタイム PCR 及び IFA により、抗 SARS-CoV 活性を持つことが明らかとなった。また、in silico screening により約 100 万種類の化合物の中から SARS-CoV の 3CL プロテアーゼ阻害剤の候補物質の中から強い抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物の同定に成功した。ウイルス RNA は、同定された化合物処理 Vero E6 cell ではコントロールと比較して 1%未満まで減少した。この物質は recombinant proteinase を用いた実験においても阻害活性を示した。マウス感染モデルでもウイルスの増殖が抑制されていた。インフルエンザウイルス侵入阻害剤であるスタキフリンの誘導體について、抗 SARS-CoV 活性の評価を行った。リアルタイム PCR でウイルス RNA の定量を行ったところ、ウイルス量がコントロールと比較して 1%未満まで減少した。感染後 3 時間で薬剤を加えると抗ウイルス活性が大幅に低下した。また、SARS-CoV spike でシュードタイプされた HIV(SARS-S-NL-luc)を用いた解析から、スタキフリン誘導體の標的が spike を介した entry の段階であることが示唆された。

また、ヒト型抗体の作製では以下の結果が

得られた。バキュロウイルスの発現系で得られた SARS-S タンパク質を、Ni カラムを用いて精製し、精製 SARS-S タンパク質を用いてヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングを行った。その結果、7種類の SARS-S タンパク質特異的モノクローナル抗体が得られた。しかし、それらの抗体は SARS-CoV 中和活性を有しないことがわかった。一方、これと並行して、2匹のマウスを精製 SARS-S タンパク質で免疫した。得られた抗血清は、SARS-S タンパク質に対して ELISA 陽性を示した。更に、これらの抗血清は、SARS-CoV 中和活性を有することが明らかになった。

4) SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：ネコ、フェレット、ハムスター、スナネズミ、アライグマおよびサルの ACE2 の DNA 配列から予想されるアミノ酸配列の長さはすべて 805 アミノ酸残基で、既に報告されているヒト、ハクビシンと同様で、機能的ドメイン（酵素活性部位、膜貫通領域、シグナル配列）も良く保存されていた。進化系統解析では、各動物は、大きく4つのクラスターに分かれた。ヒト、ネコ、フェレット、マウスの ACE2 を発現した HeLa における SARS-CoV の増殖は、ヒト ACE2-HeLa で最も効率が良く、次いで、ネコ、フェレット、マウスの順であった。各動物の ACE2-293T への VSV-SARS-S の感染効率を比較すると、ヒト ACE2-293T が最も高く、次いで、ネコ、フェレット、マウスの順で ACE2 発現 HeLa における SARS-CoV の増殖と同様の傾向を示した。

FIPV 感染での ADE に関して、猫 APN に対するモノクローナルでウイルスレセプターをブロックしても ADE 活性は抑制されなかった。I 型 FIPV 抗体を受身免疫した猫でのみ、同じ血清型の I 型ウイルスの感染に対して明らかに FIP 発症が増強された。FIP 発症ネコの PBL 減少はアポトーシスに起因し、これは FIPV による直接的なものではなく、FIP 発症ネコの Mφ から産生された TNF- α がリンパ球、特に CD8

陽性細胞のアポトーシスを誘導した結果だと考えられた。また、ADE 発現によってウイルス産生量だけでなく Mφ からの TNF- α 産生量も増加し、リンパ球のアポトーシス誘導が増加した。FIP 発症ネコ Mφ では、TNF- α と共に猫 APN の mRNA 発現量が増加していた。この Mφ での TNF- α と猫 APN の発現増加は、Mφ でのウイルス増殖が必要であり、その発現は ADE の誘導によって高められた。FIPV 感染 Mφ の培養上清中には耐熱性の猫 APN 誘導因子が存在した。組換え猫 TNF- α を処理した Mφ では猫 APN 発現が増加し、さらに、この Mφ では FIPV 感染性の増加が認められた。

豚コロナウイルス研究では、受容体 pAPN-FLAG 発現マウス細胞における増殖が、TGEV が PRCV より高いことが示され、そのウイルス産生性の差がウイルス増殖のどの段階で生じるか解析を行った。細胞への TGEV または PRCV の結合は、pAPN 陰性細胞株 VB をはじめ全ての細胞株で同程度に確認された。ウイルス接種後のウイルス N, S, M 各遺伝子合成効率は、pAPN-FLAG 発現マウス細胞株 7A および 7B と感受性 CPK 細胞において、同程度に確認された。ウイルス蛋白合成段階について解析した結果、TGEV 接種後の APN-FLAG 発現マウス細胞株 7A および 7B と CPK 細胞においてウイルス蛋白の合成が確認でき、その合成速度、合成開始時期は同程度であった。PRCV 接種後についてもほぼ同様の結果であったが、pAPN-FLAG 発現マウス細胞株 7B において、M 蛋白質に相当する分子量の蛋白の合成効率が他のウイルス蛋白合成効率に比べ低い結果が得られた。

D. 考察

1) 重症化機構に関する研究：マウス馴化ウイルスは、単独感染ではマウスに肺炎、体重減少等の臨床症状を示すことはなかったが、Pp との混合感染では、ヒト SARS と類似性の高い重症肺炎を引き起こし、マ

ウス馴化 SARS-CoV と弱病原性呼吸器細菌により、SARS の動物病態モデルを作出することができた。SARS 患者の数例からは、SARS-CoV 以外の呼吸器感染微生物 Chlamydia, などが分離されている。SARS は感染者全てが重症の肺炎に陥る訳ではなく、感染者の約 20% が重症肺炎になり、その半数が死亡すると報告されているが、20% の重症肺炎に陥るケースには、上記の呼吸器微生物などとの混合感染が原因となっていることも完全に否定できるわけではない。SARS の重症化の一つの原因として、他の病原体との混合感染が考えられる。

2) ワクチン開発に関する研究：中和活性のある血中 IgG 抗体誘導能は UV-V と UV-FV とで大差はなく、ワクチンとして十分利用可能であると思われた。興味深いことに、formalin 処理群では IL-4 産生が高くなり、それに関連して IgG2a 産生が低下して、いわゆる Th2 型に偏っていた。SARS-CoV 感染の防御には中和抗体が重要で、細胞性免疫はほとんど関与しないと考えられており、この Th2 型への多少の偏りはワクチン効果発揮においては問題ないと思われる。実際、SARS 病態モデルでの感染防御効果に両ワクチンの差は全く認められなかった。Pp との混合感染による SARS 病態形成モデルでは、ワクチン投与していないマウスはほとんど死亡したが、ワクチン接種マウスは高い抵抗性を示し、SARS-CoV 不活化ワクチンの有効性が示された。

SARS-CoV の構造蛋白の全部または一部を発現する組換え DIs は、SARS に対する安全な組換え生ワクチンとなり得ると考えられる。特に S を発現する組換え DIs には SARS 発症を抑制する効果があることが示され、この組換えウイルスはワクチンとして有効であることが証明された。SARS の発症原因として、ウイルス感染による細胞傷害よりも、感染に伴って分泌される炎症性サイトカインによる傷害が主たる原因であるという説があるが、今回の実験でもワクチン接種群とコントロール群で

IL-6、MCP-1 量に大きな差がある点は、SARS 発症におけるこれらのサイトカインの重要性を示唆しているのではないかとと思われる。

マウス及びヒト免疫応答を解析しうる SCID-PBL/hu に免疫し、中和抗体産生を誘導する SARS(S) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチン、細胞性免疫を誘導する SARS(N) DNA ワクチン及び SARS(M) DNA ワクチンを開発した。SCID-PBL/hu を用い、ウイルス増殖阻止活性を示すヒト抗体を誘導する SARS(M) DNA ワクチンを作製した。SARS(M) DNA ワクチンは M 蛋白に対する抗体の産生を誘導し、この抗体はすでに SARS に感染した細胞にも作用し、SARS ウイルスの増殖を抑制する効果が示された。マウスやサルでは SARS ウイルスに対する中和抗体産生を誘導する SARS(S) DNA ワクチンが報告されているが、ヒトの生体内で抗体産生やキラー T 誘導するか全く不明である。このような状況において、我々が世界に先駆けて確立した SCID-PBL/hu (Cancer Res, 1997) を SARS DNA ワクチンの開発に応用し、キラー T 依存性 SARS ワクチンのみならず抗体依存性 SARS ワクチンを作製しえた。このことより SCID-PBL/hu の系は、SARS ワクチンにより活性化されるヒトキラー T、ヒト B 細胞生体内ヒト免疫応答を解明する上で、強力な武器を提供することが示された。

3) 抗ウイルス剤開発に関する研究：我々は抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物として HIV プロテアーゼインヒビターのひとつであるネルフィナビル、in silico screening によって見出したプロテアーゼインヒビター、スタキフリン誘導體、ポリオキソメタレートと同定した。これらの薬剤はそれぞれ異なる分子を標的としてウイルスの複製を抑制していると推測される。例えばネルフィナビルの作用点は post-entry step、スタキフリン誘導體の作用点は entry step であると考えられている。作用点の異なるこれらの薬剤を組み合わせ

ることで、より効果的な抗 SARS-CoV 薬となることが期待される。今後はそれぞれの薬剤の抗ウイルス活性発現の詳細なメカニズム解析、in vivo での安全性や体内動態の解析を行いたいと考えている。

バキュロウイルスの発現系を用いて得た精製抗原で、ヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングした結果、7種類のモノクローナル抗体が得られたが、これらは SARS-CoV 中和活性を有しなかった。その原因としては、抗原との結合活性が十分強くない可能性が考えられる。また、7種類しかモノクローナル抗体が取れていないので、仮にヒト抗体ファージライブラリーの中に中和抗体が含まれていても、それらを単離できていない可能性もある。しかし、単純にスクリーニングしただけでは、これら7種類の抗体が重複して取れてくるので、更に別の種類の抗体を単離するには、それら7種類以外の抗体を単離するための工夫が必要と考えられる。

4) SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究: Martina (Nature 2003 (425) 915) らは、ネコやフェレットが SARS-CoV に感受性が高いことを示している。本研究においても、ネコおよびフェレットの ACE2 発現細胞における SARS-CoV の増殖や VSV-SARS-S 感染効率が、ヒトに近いことが示された。各動物の ACE2 の アミノ酸配列の違いが、SARS-CoV の S 蛋白質との親和性や SARS-CoV の増殖に関連すると思われるが、ネコやフェレットではヒトと比較して ACE2 の S 蛋白質結合部位に多数のアミノ酸置換が認められた。これらの動物種の ACE2 のキメラや変異導入により、結合に関与するアミノ酸がより詳細に明らかに出来ると考えられる。

抗体陽性猫に FIPV を接種すると、抗体陰性猫と比べて FIP 発症の時期が早まり、症状が重篤になる。この ADE に伴う病態悪化は FIPV が抗体と結合することで Mφ への感染効率が上昇し、その結果、ウイルス産生量が増加するために起きると理解さ

れている。本研究では、ADE にはウイルスレセプターは関与せず、同じ血清型の FIPV の再感染で誘導されること、および抗体と FIPV の mixture を接種した Mφ (ADE 誘導 Mφ) ではウイルス産生量の増加と共に TNF- α 産生も増加することを示した。また、ADE 誘導 Mφ の培養上清には猫 PBMC に対するアポトーシス誘導能が増加することを示した。TNF- α を介したアポトーシス誘導が ADE によって増強されること及び CD8 細胞がアポトーシス誘導を受けやすいという結果は、FIP の病態形成過程における ADE と細胞性免疫低下の関連性を示唆するものである。また、ADE はウイルス産生の増加だけではなく、TNF- α 産生の増加を介して APN 発現を up-regulate し、ウイルス感受性を増強していることが示唆された。最近、SARS ウイルス感染でも ADE 様現象が報告されており (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005, 18:797-801)、その動物モデルとしても FIPV 感染は有用な研究課題となるものと思われる。

ブタコロナウイルスの受容体である pAPN を発現するマウス細胞株を樹立、TGEV PRCV の感染性について解析を行った。ウイルス産生性は、受容体発現マウス細胞株での産生性は感受性である CPK 細胞にくらべ低かった。ウイルスの細胞への結合性は、受容体発現細胞だけではなく陰性対象細胞株でも同程度に確認され、両ウイルスのマウス NIH3T3 細胞への非特異的な結合能が示唆された。しかしウイルス RNA の合成、増加は CPK 細胞と受容体発現マウス細胞 2 株のみで同じ時期から同程度に確認されたことから両ウイルスの侵入から RNA 合成にいたる過程には受容体の存在が不可欠であると考えられた。TGEV 接種後のウイルス蛋白合成速度、合成量には CPK 細胞と受容体発現マウス細胞 2 株間に大差はみられなかった。しかし PRCV 接種後の受容体発現マウス細胞 1 株において、M 蛋白質の合成効率が他のウイルス蛋白合成効率に比べ低い結果が得られた。

M 蛋白質はヌクレオカプシドとの結合、viral core の形成やウイルス粒子形成の誘起などに関与しているとされている。TGEV と PRCV の受容体発現マウス細胞株と感受性 CPK 細胞におけるウイルス増殖の各ステップにおける増殖能は、M 蛋白質の合成効率の低下以外がほとんど同程度であることから、CPK 細胞にくらべ受容体発現マウス細胞株で PRCV の産生ウイルス力価が低い原因のひとつとしてこの M 蛋白質の合成効率の低下が関与している可能性が考えられた。

E. 結論

1) 重症化機構に関する研究：SARS 重症化機構に関する研究：微弱な呼吸器炎症を引き起こすパスツレラ菌とマウス馴化 SARS-CoV の混合感染により、肺での SARS-CoV 感染の著しい増強が認められ、感染マウスはヒト SARS と類似した重症肺炎を発症した。このことは、SARS の重症化機構の一つとして、病原性の低い呼吸器感染症との混合感染の可能性が示唆された。本研究により確立されたマウスの重症肺炎は、SARS に対するワクチン、抗ウイルス剤などの予防治療薬の開発に貢献できると考えられる。

2) ワクチン開発に関する研究：SARS ワクチンに関する研究：UV 不活化ワクチン及び UV+formalin 不活化ワクチンは同様に SARS に対する液性免疫、細胞性免疫を誘導し、マウス SARS 病態モデルにおいて両ワクチンは共に高い感染防御効果を示した。したがって UV+formalin 処理不活化ワクチンは、より安全性の高いワクチンとして有望であると思われる。この動物モデルでは特定のサイトカインが肺に大量に産生され、このことが肺病変形成に関与している可能性が示唆された。

SARS-CoV の S 蛋白を発現する組換えワクシニアウイルス DIs は、マウスに接種した場合、中和抗体産生を誘導し、また、SARS 病態モデルでは SARS 発症を完全に抑制する効果があることが示され、この組

換えウイルスはワクチンとして極めて有効であることが証明された。

SARS-CoV の S、M、N、E の各ウイルス構造タンパク cDNA を pcDNA3.1(+)ベクターに構築した SARS(S)DNA ワクチンが、マウスで SARS-CoV に対する中和抗体産生を誘導した。マウス II 型肺胞上皮 cell line (C57BL/6 由来) を用い、SARS(N) DNA ワクチンと SARS(M)DNA ワクチンが強力な T 細胞活性化 SARS ワクチンであることが示された。また、SCID-PBL/hu を免疫し、SARS(S)DNA ワクチンのみでなく SARS(M)DNA ワクチンでも SARS-CoV に対するヒト中和抗体産生を誘導した。SCID-PBL/hu を用い、SARS(N)、SARS(M) DNA ワクチンは、ヒト・キラー T 細胞分化及び増殖機能を示し、ヒト T 細胞活性化 SARS ワクチンであることを示した。

3) 抗ウイルス剤開発に関する研究：抗ウイルス剤開発に関する研究：本研究により複数の抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物が同定された。これらの中から実用的な抗 SARS-CoV 剤が開発される可能性がある。またこれらの薬剤を組み合わせることで、さらに高い抗ウイルス効果が期待できる。

SARS-S タンパク質を、バキュロウイルスの発現系を用いて発現させ、精製することができた。精製した SARS-S タンパク質を用いて、ヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングした結果、7 種類のモノクローナル抗体が単離された。しかし、これらはいずれも SARS-CoV を中和できなかった。

4) SARS 動物モデル及び動物コロナウイルスを用いた研究：フェレット、ネコの ACE2 は SARS-CoV のレセプターとしての親和性が高く、SARS-CoV 感染に関して、ヒトと同様の機能を持つことが強く示唆された。

FIPV 感染における ADE 発現と FIP 発症に関して、1) ADE にはウイルスレセプターは関与せず、同じ血清型の FIPV の再

感染で誘導されること、2) FIP の病態形成には TNF α による T リンパ球のアポトーシスが関与しているが、M Φ からの TNF α の産生は ADE によって増強されること、3) ADE により産生が増加した TNF α は autocrinally または paracrinally に M Φ に作用しウイルスレセプターの APN の発現を増強することを明らかにした。TGEV と PRCV の臓器指向性機構を解明することを目的とし、受容体発現マウス細胞株を樹立、TGEV および PRCV の感染性について解析した結果、受容体発現マウス細胞株では PRCV 産生量が低かった。感受性の CPK 細胞と受容体発現マウス細胞株を用い TGEV と PRCV のウイルス増殖の各段階について比較解析を行った結果、ウイルス結合、ウイルス RNA 合成効率では TGEV と PRCV 間に差は認められなかったが、ウイルス蛋白合成について解析したところ、受容体発現マウス細胞株 1 株において PRCV 感染で M 蛋白合成効率低下が観察された。M 蛋白質はウイルス粒子形成に関与するとされていることから、PRCV の産生ウイルス力価が低い原因のひとつとしてこの M 蛋白質の合成効率の低下が関与している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表論文

Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. *Int. Immunol.* 16:1423-1430, 2004.

Ideno, M., Furutani, T., Iwabuchi, T., Iida, Y., Iba, Y. Kurosawa, H., Sakuraba, T., Ohshima, Y., Kawarabayashi, & T. Maruyama: Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein. *Appl.*

Microbiol. Biotechnol. 64, 99-105, 2004.

S. Hidaka, Y. Akahori, & Y. Kurosawa: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 17, 10553-10567, 2004.

Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. Protease-mediated enhancement of SARS coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 102: 12543-12547, 2005.

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F., Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol* 86:2269-2274, 2005.

Saijo M, Ogino T, Taguchi F., Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods.* 125, 181-186, 2005.

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi F. Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. *J. Virol.* 79, 6102-6110. 2005.

Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jap. J. Infect. Dis.*, 58:88-94, 2005.

Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M,

- Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SICD-PBL/hu Mice. **Vaccine** 23:2269-72. 2005.
- M.Sato, R.Iwaya, K.Ogihara, R.Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa, K. Sekikawa, Intrabodies against EVH1 domain of wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. **FEBS J.** 272, 6131-6144. 2005.
- Matsuyama S, Ujike M, Ishii I, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. **Adv. Exp. Med. Biol.** 581: 253-258. 2006.
- Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi F. Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation **Adv. Exp. Med. Biol.** 581: 331-334. 2006.
- Nakagaki K, Nakagaki K and Taguchi F. Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture. **Adv. Exp. Med. Biol.** 581: 327-330 2006.
- Ishii K., Yokota Y., Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi F., Miyamura T. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. **Adv. Exp. Med. Biol.** 581: 593-596 2006.
- Zamoto A, Taguchi F., Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 581: 519-522. 2006.
- Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F., Kurane I and Morikawa S. Pseudotype vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein **Exp. Med. Biol.**, 581: 293-296. 2006.
- Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kanaji Y, Kurane I, Taguchi F., Tashiro M, and Morikawa S. Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. **J Med Virol.** 78: 1509-1512. 2006.
- Ishii K., Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F., Tashiro M, Takemori T, Miyamura T and Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. **Virology** 351: 368-380. 2006.
- Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F. Receptor-independent infection of murine coronavirus:analysis by spinoculation. **J. Virol.** 80: 4901-4908 2006.
- Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. **Jap. J. Infect. Dis.**, in press, 2007.
- Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori, T. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: application of monoclonal antibodies and development of an effective vaccine. **Rev. Med. Virol.** 16:117-131. 2006.
- Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shirota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. **Arch. Virol.** In press
- Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. **Emerg. Infect. Dis.**, in press.
- Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India 2006.
- Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shirota K.,

- Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 347: 261-265 2006.
- Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. **Virology** 351: 368-380. 2006.
- Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, DeMello D, Chen P.J, Yamamoto Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. **Adv. Exp. Med. Biol.** 581-566, 2006
- Okada M., Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. **Vaccine** (in press)
- Yamamoto N, Yamamoto N. RNAi and SARS. **RNAi Therapeutics.** 2006: 79-99
- Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N. Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. **Biomed Pharmacother.** 60:211-9.2006.
- Takano T, Hohdatsu T. Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. **Vet. Microbiol.** 119: 121-131. 2007.
- Takano T, Hohdatsu T. Toda A, Tanabe M, Koyama H. 2007. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. **Virology**, In press.
- 水谷哲也、田口文広 : SARS ウイルスのワクチンからだの科学、増刊 21-27、2004
- 水谷哲也、田口文広 : SARS ウイルス-ワクチン開発と現状総合臨床、第 53 号、1968-1975、2004
- 田口文広、田代真人 : 重症急性呼吸器症候群 (SARS) と SARS コロナウイルス 化学と生物、第 42 号、546-552、2004
- 水谷哲也、田口文広 : SARS コロナウイルスのワクチン開発細胞工学、23 7 月 759-800 2004
- 田口文広 : SARS の迅速診断キットインフルエンザ 第 5 号、39-45、2004
- 田口文広 : SARS コロナウイルスとワクチン臨床と研究 第 81 巻 69-74
- 田口文広 : SARS コロナウイルスとワクチン開発、現代化学第 404 号、45-51、2004
- 田口文広 : SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005
- 田口文広 : SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005
- 田口文広 : SARS 「ネオエスカ感染症・アレルギーと生体防御」同文書院 27-31、2005
- 田口文広 : SARS SARS コロナウイルス : 特集「動物由来ウイルス感染症」日本臨床 63 巻 12 号 2113-2120 2005
- 田口文広 : マウス肝炎ウイルスおよび SARS コロナウイルスの細胞侵入機構 : 病原性発現への関与 実験医学 第 23 巻 No. 17 28-33 (増刊) 2005
- 岡田全司、橋元里実 : SARS ワクチン. 医

学のあゆみ vol.214 No.12, 1025-1026 2005

田口文広：コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現との関連 ウイルス 第56巻 第2号 165-172 2006

田口文広：SARS コロナウイルスの特徴とワクチン開発 化学療法の領域 第22巻 第12号 33-38 2006

田口文広：重症急性呼吸器症候群（SARS）分子呼吸器病 第11巻 第1号 42-47 2007

田口文広：SARS コロナウイルス感染症臨床とウイルス 第43巻 第5号 423-428 2006

石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 医学のあゆみ 218：839-844 2006

PCT/JP2005/016151、抗 SARS ウイルス剤、2005年9月2日

特願 2005-064664、プロテアーゼインヒビター、2005年3月8日

特願 2004-255819、抗 SARS ウイルス剤、2004年9月2日

H. 知的所有権の取得状況

石井孝司

2004-242937・石井孝司他 12名・財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス DIs 株。・2004年8月23日出願

2004-225043・石井孝司他 4名・独立行政法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DIs 株、およびその利用。・2004年8月2日出願

山本典生

特願 2006-215485、抗ウイルス材及び環境反応型抗ウイルス材、2006年8月8日

PCT/JP2006/303905、プロテアーゼインヒビター、2006年3月1日

発表論文

Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. **Int. Immunol.** 16:1423-1430, 2004.

Ideno, M., Furutani, T., Iwabuchi, T., Iida, Y., Iba, Y., Y. Kurosawa, H. Sakuraba, T. Ohshima, Y. Kawarabayashi, & T. Maruyama: Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64, 99-105, 2004.

S. Hidaka, Y. Akahori, & Y. Kurosawa: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. **J. Neurosci.** 17, 10553-10567, 2004.

Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. Protease-mediated enhancement of SARS coronavirus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.** 102: 12543-12547, 2005.

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. **J Gen Virol** 86:2269-2274, 2005.

Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. **J. Virol. Methods.** 125, 181-186, 2005.

Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi F Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. **J. Virol.** 79, 6102-6110. 2005.

Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. **Jap. J. Infect. Dis.**, 58:88-94, 2005.

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SICD-PBL/hu Mice. **Vaccine** 23:2269-72. 2005.

M.Sato, R.Iwaya, K.Ogihara, R.Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa, K. Sekikawa, Intrabodies against EVH1 domain of wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. *FEBS J.* 272, 6131-6144. 2005.

Matsuyama S, Ujike M, Ishii I, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 253-258. 2006.

Watanabe R, Suzuki K, and Taguchi F. Receptor independent infection of mouse hepatitis virus : analysis by spinoculation *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 331-334. 2006.

Nakagaki K, Nakagaki K and Taguchi F. Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 327-330 2006.

Ishii K, Yokota Y, Takemori T, Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa S, Taguchi F, Miyamura T. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596 2006.

Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa S and Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its recertor function for SARS-coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 581: 519-522. 2006.

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I and Morikawa S. Pseudotype vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein *Exp. Med. Biol.*, 581: 293-296. 2006.

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kanaji Y, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, and Morikawa S. Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *J Med Virol.* 78: 1509-1512. 2006.

Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T and Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology* 351: 368-380. 2006.

Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F Receptor-independent infection of murine coronavirus:analysis by spinoculation. *J. Virol.* 80: 4901-4908 2006.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*, in press, 2007.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori, T. Severe acute respiratory

syndrome (SARS) coronavirus: application of monoclonal antibodies and development of an effective vaccine. *Rev. Med. Virol.* 16:117-131. 2006.

Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shirota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Arch. Virol.* In press

Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.*, in press.

Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India 2006.

Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shirota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347: 261-265 2006.

Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* 351: 368-380. 2006.

Okada M., Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris M, DeMello D, Chen P.J, Yamamoto Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. : Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581-566, 2006

Okada M., Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine* (in press)

Yamamoto N, Yamamoto N. RNAi and SARS. *RNAi Therapeutics.* 2006: 79-99

Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N. Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed Pharmacother.* 60:211-9.2006.

Takano T, Hohdatsu T., Hashida Y, Kaneko Y, Tanabe M, Koyama H. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of

cats with feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* 119: 121-131. 2007.

Takano T, Hohdatsu T, Toda A, Tanabe M, Koyama H. 2007. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*, In press.

水谷哲也、田口文広：SARS ウイルスのワクチンからだの科学、増刊 21-27、2004

水谷哲也、田口文広：SARS ウイルス-ワクチン開発と現状総合臨床、第 53 号、1968-1975、2004

田口文広、田代真人：重症急性呼吸器症候群（SARS）と SARS コロナウイルス 化学と生物、第 42 号、546-552、2004

水谷哲也、田口文広：SARS コロナウイルスのワクチン開発細胞工学、23 7 月 759-800 2004

田口文広：SARS の迅速診断キットインフルエンザ 第 5 号、39-45、2004

田口文広：SARS コロナウイルスとワクチン臨床と研究 第 81 巻 69-74

田口文広：SARS コロナウイルスとワクチン開発、現代化学第 404 号、45-51、2004

田口文広：SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005

田口文広：SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻、129-134、2005

田口文広：SARS 「ネオエスカ感染症・アレルギーと生体防御」同文書院 27-31、2005

田口文広：SARS SARS コロナウイルス：特集「動物由来ウイルス感染症」日本臨床 63 巻 12 号 2113-2120 2005

田口文広：マウス肝炎ウイルスおよび SARS コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現への関与 実験医学 第 23 巻 No. 17 28-33 (増刊) 2005

岡田全司、橋元里実：SARS ワクチン. 医学のあゆみ vol.214 No.12, 1025-1026 2005

田口文広：コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現との関連 ウイルス 第 56 巻 第 2 号 165-172 2006

田口文広：SARS コロナウイルスの特徴とワクチン開発 化学療法の領域 第