

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

SARSコロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

平成16年度 ～ 平成18年度

総合研究報告書

主任研究者 森川 茂
(国立感染症研究所)

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究	1
森川 茂 (国立感染症研究所・ウイルス第1部)	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	23
------------------------	----

I. 総合研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長 森川 茂

研究要旨：重症急性呼吸器症候群（SARS）は、2003年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。日本では SARS 発生直後から水際の懸命な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国で感染者が発生することを想定して迅速診断体制を整備することが必要である。SARS コロナウイルス(SARS-CoV)は BSL3 での取扱いが必要であるが、海外（シンガポールと中国）の研究室で、実験室感染が報告され、中国では実験室感染者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでた。このため、実験室診断、特に血清診断に用いる抗原調製に大量の SARS-CoV の培養を行う必要のない組換え抗原を用いた診断系を開発した。特に血清診断で最も信頼性の高いウイルス中和試験においても SARS-CoV の培養を必要としない系を開発した。RT-LAMP の評価及び改良に関しても検討した。また、簡便に臨床現場でのウイルス抗原の検出が可能なイムノクロマト法を開発した。類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断用 RT-LAMP を開発し、特にインフルエンザとの迅速鑑別が可能であることを明らかにした。さらに、SARS のような新興ウイルス感染症発生時に、病原ウイルスの特定と遺伝子情報を迅速に得られるようなシステムの開発も行なった。また、ウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である SARS-CoV の感染モデル動物の開発を行なった。本研究では、これらに関して以下の研究成果を得られた。

- 1) SARS-CoV 培養抗原の作製は BSL3 レベルで行い、ウイルスの不活化を確認する必要がある。そこで、安全に抗原を調製するために、SARS-CoV の組換え N 蛋白を発現、精製して抗体検出 ELISA を確立した。特に他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで、特異性を高めることに成功した。この抗原を用いた IgG-ELISA、IgM 捕獲 ELISA を開発し、抗体検出までの window period を短縮できた。より簡便な凝集(PA)法も開発した。
- 2) 最も信頼度の高い抗体検査法であるウイルス中和抗体測定法を安全かつ迅速に行うために、SARS-CoV の S 蛋白を被った VSV-pseudotype を用いた中和試験を開発した。よりハイスループットな系として分泌型酵素を発現する系も開発した。これらにより中和抗体測定が 10 時間で可能になった。また、ウイルスレセプターである ACE2-VSV-pseudotype 及び ACE2 組換え VSV を作製し、中和試験への応用が可能であることを明らかにした。
- 3) SARS-CoV の N 蛋白の単クローン抗体を用いた迅速なイムノクロマトを開発した。
- 4) SARS-CoV ゲノム検出に関しては、LAMP 法の感度向上を目的として、ヘパリン・ラクトフェリンの阻害の影響の小さな逆転写酵素の使用及び RT-LAMP 反応系に RNase inhibitor の添加に関して検討した結果、感度向上効果が期待できた。RNA 抽出キットに

関しては、Qiagen RNA 抽出キットが比較的安定した成績を示し、さらに抽出 RNA を濃縮することで 5-10 倍高感度になった。また、より迅速化するために RNA 抽出キットを用いずに行なえる簡易前処理法を開発した。

5) 迅速鑑別診断用 LAMP 法に関しては、インフルエンザウイルス A, B、ヒトコロナウイルス 229E、マイコプラズマ検出用 LAMP 法を開発した。特にインフルエンザでは、患者検体を用いて評価した結果、市販イムノクロマトキットと比較して検出感度がかなり高かった。

6) 新興ウイルス感染症発生時に、ウイルスの遺伝子情報が不明でもその遺伝子を増幅する方法として改良 RDA 法及び RDV 法を開発した。RDV 法により、SARS-CoV 遺伝子や種々のウイルス遺伝子配列情報の取得を遺伝子組み換えを行わずに可能にした。

7) SARS-CoV 感染小動物モデル系の開発に成功した。マウス、ラットでそれぞれ in vivo 継代した SARS-CoV を感染させると、それぞれの加齢動物で肺水腫を伴う SARS 様症状を呈した。マウスでは 30-50%の致死率であった。

8) SARS-CoV のレセプター(ACE2)トランスジェニックマウスを作製し SARS-CoV を感染した結果、肺および脳での高いウイルス増殖を伴い致死的な感染が観察された。

これらの研究成果により、SARS の検査法の精度向上及び迅速化ができた。また、SARS-CoV を使用しないためより安全に検査を行う体制が確立された。今後 SARS 患者が発生した場合に、より迅速かつ的確に検査を行うことができる。

分担研究者：

奥野良信（大阪府立公衆衛生研究所部長）

北村義浩（東京大学医科学研究所感染症分野助教授）

田代真人（国立感染症研究所ウイルス第3部部長）

棚林清（国立感染症研究所獣医科学部室長）

納富継宣（栄研化学株式会社生物化学研究所第2部部長）

長谷川秀樹（国立感染症研究所感染病理部室長）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所病原体解析部門分子構造解析分野教授）

松浦善治（大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター教授）

福士秀悦（国立感染症研究所ウイルス第1部）

永田典代（国立感染症研究所感染病理部）

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は、2003年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。日本では、水際での懸命な防疫が実施されたこともあり、患者発生はなかったが、今後、我が国においても感染者が発生することを想定して対応することが必要である。SARS の初期症状は、インフルエンザ等のそれと類似し臨床的な鑑別は不可能であることから、より高感度で迅速な実験室診断が求められる。また、SARS-CoV を扱っている海外(シンガポールと中国)で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例がでたことから、ウイルス培養を必要としない安全な実験室診断体制の確立は急務である。SARS が临床上疑われた場合、より迅速、正確に診断を可能にすることにより、患者の隔離、二次感染防止

対策をより有効に行うことができる。SARS コロナウイルス(SARS-CoV)特異抗体は、ウイルス抗原を用いた抗体検出系では、発症後 9 日程度から検出できるが、組換え抗原を用いた高感度検出系により抗体検出までの window 期間をできるだけ短縮する必要がある。また、他のヒトコロナウイルスとの抗原性の交差反応にも留意する必要がある。一方、抗体応答前にはウイルス直接検出法として LAMP 法等によるウイルス遺伝子検出が有効であるが、改良が可能であるか検討する必要がある。臨床現場での簡易抗原検出法としてイムノクロマト法の開発も重要である。また、類似の初期症状を呈する呼吸器感染症との鑑別診断も院内感染対策、公衆衛生学の観点から必要である。さらに、SARS の様な新興ウイルス感染症が今後発生した場合に、ウイルス遺伝子情報が未知の時点でも遺伝子増幅が可能であれば、病原ウイルスの同定や検査系の開発はるかに短縮できる。また、SARS-CoV の感染モデル動物の開発は、病原性の解明、ワクチンや抗ウイルス薬の有効性試験に活用できるだけでなく、感染後のウイルス増殖部位の同定、免疫応答を詳細に検討できる点から、診断法の評価にも有用である。

本研究では、抗体検出感度を上げて抗体検出までの window 期間を短縮すること、抗体検出法の迅速化、安全なウイルス中和抗体測定法の開発、ウイルス遺伝子・蛋白の検出法の改良と至適サンプルの検討を行い、SARS の実験室診断の精度向上と迅速化を行うことを目的とした。本研究は平成 16 年度より 3 年間でこれらを達成することを目標に、上記分担研究者と協力して研究を行い当初の目的をほぼ達成した。これらの成果により、より迅速で安全な実験室診断法を統括的に開発することができた。

B. 研究方法

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた IgG, IgM 抗体検出法の開発 :

C 末端に His-tag を付加した SARS-CoV N 蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、感染昆虫細胞から組換え蛋白を精製し IgG-ELISA を開発し、ベトナムの臨床検体を用いて評価した。

一方、SARS-CoV N 蛋白の N 末端に His-tag を付加し、N 末端 121 残基を除いた SARS-CoV NΔ121 組み換え蛋白を用いた IgG-ELISA, IgM 補足 ELISA 法を開発し、同様に評価した。また、表層に NΔ121 を固定化した Ha-Ny ビーズを調整した。抗 IgG, 抗 IgM 抗体を固相化した V 字型 96 穴プラスチックプレートに検体を添加して IgG, IgM を捕獲し、ビーズを添加して反応を目視で判定できる系を開発し、同様の抗原を用いた ELISA 法と感度を比較した。

(2) VSV-pseudotype や組換え VSV による SARS-CoV 迅速中和抗体測定法の開発 :

SARS-CoV S 蛋白の C 末端側の細胞質ドメイン 19 アミノ酸を欠損させた S 蛋白を被った VSV-pseudotype を作製した。マーカーとして GFP 発現する系を用いたウイルス中和試験法を開発し、臨床検体を用いて評価した。また、中和試験をよりハイスループットな系にするために、感染のマーカーとして VSV-pseudotype 感染細胞で分泌型アルカリフォスファターゼを発現する系を開発し、培養上清の酵素活性を想定することにより、より迅速に多量検体のウイルス中和抗体の測定を可能にすることを試みた。

また、VSV の G 遺伝子を SARS-CoV のレセプターである ACE2 遺伝子に組換えた組換えウイルスを作製した。この組換えウイルスを用いて、SARS-CoV S 蛋白発現細胞でのみ増殖可能なウイルスを作製し、ウイルス中和抗体測定法への応用を試みた。

(3) SARS 迅速抗原検出キット開発：

イムノクロマト法による迅速診断法を開発するための単クローン抗体を検討した。イムノクロマト法での反応検出法としては、金コロイド法とラテックス凝集法を比較検討した。開発したイムノクロマト法の感度を感染力価の既知の SARS-CoV を用いて検討した。

(4) SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性の検討：

栄研化学株式会社で製造した SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性を国立感染症研究所ウイルス第3部自家製 RT-PCR 試薬、香港中文大学医学部自家製 RT-PCR 試薬、香港特別行政区衛生部ウイルス部門 自家製 RT-PCR 試薬と比較検討した。検体は、香港、ベトナムの SARS 患者および接触者から様々な日時に採取した、血清(血漿)、咽頭拭い液・咽頭鼻腔拭い液、糞便などを用いた。

(5) RT-LAMP 法の改良のための研究：

栄研化学株式会社で現行開発済みの試薬のプライマーは SARS-CoV ゲノムの塩基配列番号 18,000 近辺の領域に設定している。本年度の研究では、感度向上を目的として、9,000 付近、14,000 付近及び 28,000 付近を中心にプライマー設計を行い、感度を比較した。また、逆転写工程を改善するために、21 種類の逆転写酵素を比較検討した。現在ウイルス RNA の抽出には、QIAGEN 社の RNA 抽出キットを用いているが、抽出 RNA の 10 分の 1 しか増幅反応へ持込めない。そこで検体の濃縮を兼ねた新規ウイルスゲノム抽出法の検討を行った。より迅速化するために、RNA 抽出キットを用いた RNA 抽出過程を行わずに検体を前処理液で処理後に直接 RT-LAMP 反応が行なえる処理法を検討した。検体として咽頭スワブを用い

ることが想定されるが、SARS 患者の咽頭スワブ検体が入手不可能であるため、インフルエンザウイルス検出用 RT-LAMP を用いて前処理法を評価した。

(6) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の開発：

SARS-CoV と初期症状の類似する A 型・B 型インフルエンザウイルス、ヒトコロナウイルス 229E、マイコプラズマを対象とした LAMP 法を開発した。作製したプライマーセットの感度を客観的に調べるために対象ウイルスの増幅対象領域のいずれか 1 つと HIV の p24 領域を有するレトロウイルスベクターを作製した。このベクター粒子から RNA を調製し、これを試料として RT-LAMP 法で核酸検出を行った。

また A 型インフルエンザ検出用 RT-LAMP 法を臨床検体を用いて、市販のイムノクロマト法のキットと比較して評価した。

(7) SARS のような新興ウイルス感染症発生時の迅速なウイルス同定と遺伝子配列決定砲の開発：

改良 Representational difference analysis (RDA 法)を用いた SARS-CoV の検出：RDA 法は、未知のウイルス遺伝子の増幅法として理論的に優れた方法であるが、細胞に多量に存在する ribosomal RNA が反応の非特異反応の原因となり実用化されていない。そこで、ribosomal RNA での出現頻度の低い 6mer oligo を 96 種混合したプライマーによる逆転写反応により作製した DNA から、RDA 法を用いて SARS-CoV 特異的プライマーを用いずに SARS-CoV 遺伝子が増幅できるか検討した。

Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法の開発：ウイルス粒子外の主に細胞に由来する核酸を nuclease 処理により除去し、特異的 primer を用いない全遺伝子増幅技術を用いて遺伝子を均等に増

幅し、さらにアダプターを付加した後に特殊な primer sets による PCR を行い、均一な amplicon を増幅してダイレクトシーケンスを行なう系の開発を行った。

(8) SARS-CoV 感染カニクイサルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析：

SARS-CoV を経鼻、気管内、静脈内、胃内接種したカニクイザルから接種後 1 日おきに血液、咽頭、鼻腔、直腸拭い液を採取した。各拭い液と末梢血単核系細胞からのウイルス分離および感染性ウイルス量を測定した。また、病理組織学的に解析した。

(9) SARS-CoV の齧歯類への馴化と SARS 発症モデル系の開発：

SARS-CoV をラットあるいはマウスに経鼻接種し、感染 3 日目の肺洗浄液を同様に感染するウイルス継代を行い、ウイルス遺伝子の変異、ウイルスの病原性の増強効果を検討した。この馴化ウイルスを加齢動物に感染することにより SARS 発症モデルの開発を試みた。

(10) ACE2 トランスジェニックマウスを用いた SARS 感染モデル系の開発：

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスをこれまでに作製し、その肺および腎臓の初代培養細胞での SARS-CoV の増殖が、対象マウスの細胞と比べて極めて良いことを明らかにしてきた。今年度は、3 ラインのトランスジェニックマウスを増殖し、SARS-CoV の感染実験を行い、SARS 感染もでる系としての有用性を評価した。

(倫理面への配慮：ヒト検体の使用に当っては、各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た。動物実験は、各研究機関の動物実験委員会の承認を得た。遺伝子組換え実験は、遺伝子組換え生物等の使用（第

二種使用）の承認を得た。）

C. 結果

(1) 組換え SARS-CoV 抗原を用いた血清診断系の開発：

組換えバキュロウイルスにより昆虫細胞で発現、精製した N 蛋白を用いた IgG-ELISA は、ウイルス抗原を用いた ELISA と比較した感度、精度は 94%、ウイルス中和試験法との比較で感度、精度が 92%であった。

一方、より大量な抗原調整が可能な大腸菌で発現、精製した SARS-CoV の N および N_{Δ121} 蛋白を抗原とした ELISA 法では、健常人血清での非特異反応が 20%程度認められた。これは、組換えバキュロウイルスで発現、精製した N 蛋白と大腸菌で発現した N 蛋白の立体構造が異なるためと考えられる。N 蛋白のアミノ酸配列の比較から N 蛋白の N 末端にコロナウイルス共通配列があるが、この部位が大腸菌で発現した N 蛋白では抗原性を示し、多くのヒトコロナウイルス抗体により認識される可能性がある。そこで、N 末 121 アミノ酸を除去した N_{Δ121} 蛋白を用いた IgG-ELISA 法の評価をベトナム人 SARS 患者血清を用いて実施した。その結果、37 名の SARS 患者血清中 97%が陽性を示した。また、ウイルス抗原を用いた ELISA と比較して N_{Δ121} 蛋白による ELISA は高感度であった。この抗原を用いた IgM 補足 ELISA 法では、臨床検体を用いた評価で感度、精度が 100%であった。また、行為検出までの window 期間は、最短で IgM 抗体が発症 5 日、IgG 抗体が 6 日で検出できた。これは、ウイルス抗原を用いた ELISA 法で最短 9 日で抗体が検出できるのと比べて window 期間が短縮できたことになる。さらに、簡便な抗体検出法を開発するため、N_{Δ121} 蛋白をビーズに固相化して PA ビーズ法を開発した。ELISA 法と比較して同等以上

の感度であった。

(2) VSV-pseudotype や組換え VSV による SARS-CoV 迅速中和抗体測定法の開発：

ヒト血清 56 サンプルを用いて中和試験を行ったところ VSV-pseudotype を用いた中和試験は SARS-CoV を用いた中和試験に比べて感度 97%、特異性 86%であった。VSV-SARS-St19 を用いた場合と、SARS-CoV を用いた場合の中和抗体価には正の相関が認められ、前者の抗体価が高かった。さらに、SARS-CoV を用いた中和試験で陰性であった3検体が、VSV-SARS-St19 を用いた中和試験では陽性を示した。この3検体は、その後抗体が陽転していることから、VSV-SARS-St19 を用いた中和試験は、より高感度であり検体によっては、window 期間を短縮できると考えられた。

開発、評価した VSV-pseudotype を用いた中和試験は、VSV-pseudotype 感染の指標である GFP 発現を蛍光顕微鏡下で観察する系であるため、少数の検体の中和試験には適しているが、他検体の処理には時間を要する。そこで、マーカー遺伝子に分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子を持つ VSV-pseudotype を作製し、Vero E6 細胞に感染後、培養上清中に分泌される酵素活性を化学発光法によりマイクロプレートルミノメーターを用いて測定する方法を開発した。本方法により 96 ウェルプレートでのシェードタイプの感染性を同時に解析することが可能となった。

一方、レセプターである ACE2 を同様に pseudotype した VSV を作製したところ、SARS-CoV S 蛋白発現細胞特異的に感染した。そこで、VSV G 遺伝子を ACE2 遺伝子に置き換えた組換え VSV を作製した結果、同様に S 蛋白発現細胞に感染した。この組換え VSV は、VSV-pseudotype と異なり S 蛋白発現細胞では、自立増殖できる。組換

え VSV 感染は、抗 ACE2 抗体、抗 SARS-CoV 抗体で阻害されたことから、中和試験への応用が可能であると思われる。

(3) SARS 迅速抗原検出キット開発：

SARS-CoV の S 蛋白及び N 蛋白に対する単クローン抗体を用いてイムノクロマト法での検出感度の高い組み合わせを検討した結果、N 蛋白に対する 2 種類の単クローン抗体 (SKTO8 と SKTO9) を用いたラテックス粒子法によるイムノクロマト法が最も感度が高かった。ヒトのコロナウイルスを含む種々のウイルス、細菌との交差反応は全く認められなかった。SARS-CoV は、感染価 10^6 PFU/mL 以上では明瞭に検出できた。本試験法は、10 分程度で結果が得られる。

(4) SARS / RT-LAMP 検出試薬の有用性の検討：

ベトナムからの送付検体 279 検体 (141 名分の検体) を感染研での自家 RT-PCR 法と RT-LAMP 法で比較した結果、前者では 1 例のみ陽性で、後者では 30 検体が陽性を示した。このことから、RT-LAMP 法の感度が極めて高いことが明らかとなった。WHO からのパネル検体でも、同様に RT-LAMP 法の方が検出可能なサンプルが多かった。香港中文大学、香港特別行政区政府衛生署に依頼して行った結果では、それぞれの期間での自家 RT-PCR 法と同程度の感度であったが、自家 RT-PCR では RNA を濃縮したり、また LAMP 法ではサンプルを複数回凍結融解した検体を用いて行ったりしているため、実験室内の交差汚染による擬陽性の問題等も考慮すると、RT-LAMP 法の有用性は高い。

(5) RT-LAMP 法の改良のための研究：

市販 RNA 抽出キットを比較検討した結果、QiagenRNA 抽出キットが比較的安定した成績を示した。また、感度を更に高める

ために、RNA 抽出濃縮方法により得られた RNA 標品を用いて LAMP 法を実施したところ、検出感度は更に 5~10 倍程度上昇した。

LAMP 法に用いるプライマーの改良を目的として、SARS-CoV の nuc.14,000、28,000 近辺の領域でさらにプライマー設計を行ったが、現行のキット以上の成績は得られなかった。このことは、現行キットのプライマーが優れていることを示している。LAMP 法に用いる逆転写酵素による感度を種々の逆転写酵素で比較したが感度向上は認められなかった。しかし、逆転写反応の阻害活性のあるラクトフェリンとヘパリンの影響が小さいものが 1 種みつかった。また、反応溶液に RNase inhibitor を添加することにより RNase の影響抑制に有効であった。

より迅速化するために、検体を前処理して直接反応系に加える系を開発した。SARS 患者の咽頭スワブ検体が入手困難であるため、評価系にはインフルエンザ A 型用の RT-LAMP 系を用いた。その結果、咽頭スワブの生理食塩水懸濁液を非イオン性界面活性剤、RNase inhibitor を含む処理液と等量混合し、80°C、5 分間処理後、RT-LAMP 系に加えたところ、25 μ L の LAMP 反応液中に最大 4.5 μ L まで持ち込むことが可能であった。この前処理法により、SARS-CoV の RT-LAMP はより簡便で迅速化できることが明らかになった。

(6) SARS 鑑別診断用 LAMP 法の評価：

HIV-1 p24 遺伝子断片と標的微生物の標的領域を連結させたキメラ核酸を標的遺伝子として、LAMP 法の感度を正確に比較する系を確立した。この系を用いて、種々のプライマーセットを作製して検討した結果、A 型インフルエンザウイルスとヒトコロナウイルス 229E に関しては極めて高感度の LAMP 法が確立できた。B 型

インフルエンザウイルス、*Mycoplasma pneumoniae* に関しては、HIV-1 p24 検出系と同等か高感度な LAMP 法が作製された。

開発したインフルエンザ A 型検出 RT-LAMP 法を、冬季に発生した上気道炎症状を有する発熱成人患者の鼻咽頭ぬぐい液検体 (310 検体) を対象に、市販のイムノクロマトキットと比較した結果、市販キットでは 100 検体からインフルエンザ A 型抗原が検出された。一方、RT-LAMP 法では 188 検体からインフルエンザ A 型遺伝子が検出され、市販のイムノクロマトキットより高感度であることが明らかとなった。

(7) SARS のような新興ウイルス感染症発生時の迅速なウイルス同定と遺伝子配列決定砲の開発：

改良 Representational difference analysis (RDA 法)を用いた SARS-CoV の検出：RDA 法は、原理的にはウイルス感染細胞 RNA 由来 cDNA から非感染細胞 RNA 由来 cDNA により細胞 RNA 由来 cDNA を subtract することによりウイルス由来 cDNA を増幅する方法であるが、大量に存在するリボゾーム RNA 由来 cDNA の除去が難しく実用化されていない。そこでリボゾーム RNA には出現頻度が極めて低いが、多くの RNA ウイルスゲノムに広く存在する 6 塩基配列を検索し、96 種類のプライマーを合成した。SARS-CoV 感染細胞と非感染細胞から抽出した RNA を用いて、これらの混合プライマーにより RDA 法の逆転写反応を行った結果、最終的に RDA 法で得られた PCR 産物が SARS-CoV の遺伝子由来であった。この改良 RDA 法は、特定のウイルスを標的とした”specific primer”を用いることなく、感染細胞から SARS-CoV を検出できることから、SARS の様な新興ウイルス感染症発生時に有用な遺伝子検出法であると考えられる。

Rapid Determination of Viral RNA

Sequence (RDV)法の開発：SARS-CoV やマウスウイルス培養上清から細胞由来 DNA、RNA を除去した後にウイルス RNA を抽出し cDNA を作製し、全遺伝子増幅キットを用いてウイルス遺伝子 cDNA の 1 次ライブラリーを作製した。Hae III 切断とリンカーライゲーション後に、特別にデザインした primers の組み合わせ 96 種類で 2 次 PCR を行なった結果、いくつかの primers 組み合わせでシングルバンドとして PCR amplicon が得られた。これらをダイレクトシーケンスすると amplicon の半数以上がウイルス遺伝子を含んでいた。この RDV 法は 2 日以内に遺伝子情報が得られる。また、ウイルスの遺伝子情報が不要であるため新興・再興ウイルス感染症発生時にウイルス遺伝子情報を得て原因ウイルスを迅速に同定する上で有用であると考えられる。

(8) SARS-CoV 感染カニクイサルにおけるウイルスの動態と免疫応答の解析：

気管内、経鼻あるいは静脈内接種後のカニクイサルの直腸拭い液からウイルスゲノムが RT-PCR により一定期間検出された。気管内と経鼻接種のサルでは感染性ウイルスの検出は困難であったのに対し、静脈内接種後の動物では感染性ウイルス量は高かった。病理組織学的解析では、気管内接種後 7 日目のサルの肺に最も強い病変が認められた。この肺の肺胞上皮にウイルス抗原が検出され、マクロファージを主体とする炎症性反応がみられた。10⁶TCID₅₀ 量経鼻接種後 7 日目の動物の肺で同様の病変が見られたが軽度であり、鼻腔粘膜上皮の一部でウイルス抗原が検出された。気管内および経鼻接種後 3 週間目に解剖した動物ではウイルス抗原は検出されず、炎症の修復過程である軽度の線維増生が見られるのみであった。静脈内接種後 14 日目の直腸粘膜上皮においてウイルス抗原が検出されたが、

肺病変は認められなかった。SARS 患者では、RT-PCR によるウイルスゲノムの検出は 6-14 病日の便サンプルが最も効率が良いと報告されている。この疫学調査の結果とサル実験の結果はよく一致した。また、患者血清中の中和抗体は 14-21 病日以降上昇が観察されたと報告されており、これもサル実験の結果と一致した。これらのサンプルは、各種検査法の評価用サンプルとしても有用である。

(9) SARS-CoV の齧歯類への馴化と SARS 発症モデル系の開発：

SARS-CoV Frankfurt 株をラットで *in vivo* 継代した。10 代ラットで継代すると、SARS-CoV の S 蛋白の ACE2 結合領域に一ヶ所アミノ酸の置換変異が認められ、さらにラットに接種すると、接種後 3, 5 日目の組織中のウイルス力価は継代後で有意に増加した。ラット馴化 SARS-CoV を用いて 4 週齢と 8 ヶ月齢の動物に感染実験を行ったところ、8 ヶ月齢のラットで強い肺水腫を伴う SARS 様病変が観察された。このモデルにおけるウイルスの感染局在と抗体価について調べた結果、鼻腔粘膜上皮、気管と肺胞の上皮でのみウイルス抗原陽性細胞が検出され、リンパ節からウイルスが分離された。血清中からウイルスは分離されず、感染後 5 日以降から中和抗体価の上昇が観察された。ラット馴化 SARS-CoV 感染モデルを作製した。

一方、マウス馴化 SARS-CoV の感染実験を行ったところ、ラットと同様に齢による病態の相違がみられた。また、半年齢マウスでは強い肺水腫とびまん性肺胞傷害を呈す SARS 類似の病態を示し、かつ、30-50% の致死率であった。高齢者における SARS 発症機序やウイルス動態、免疫応答を解明するための有用な動物モデルを確立した。

(8) ACE2 トランスジェニックマウスを用いた SARS 感染モデル系の開発：

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスの 1 ラインについて、目的遺伝子が導入された 8 週令または 10 週令マウス及び同腹の遺伝子導入陰性マウスの摘出肺及び腎臓の初代培養を行ない、SARS-CoV を接種し 3 日間の観察と培養上清の回収及びウイルス感染価の測定を行った。陽性マウス由来肺及び腎細胞では 2 日から 3 日目には細胞の培養面からの剥離が見られたが、対照マウス由来細胞では見られなかった。培養細胞上清中のウイルス力価を 8 週令または 6 週令各 1 頭の肺由来初代培養細胞ではウイルス接種後 24 時間目で $2 \times 10^{5.67}$ から 7.5 TCID₅₀/mL のウイルス増殖が認められた。また、腎由来細胞では 2×10^5 から 6.67 TCID₅₀/ml の増殖が認められた。ウイルス接種後 3 日目では、ウイルス量の減少が見られた。一方、同腹の対照マウス由来培養細胞では腎細胞で 3 日目に少量のウイルスが認められたが、ほとんど検出限界以下であった。これらのことから、本ラインのトランスジェニックマウス由来細胞では SARS-CoV が極めて効率よく増殖することが明らかとなった。さらに、これまでに確立した 3 ラインのトランスジェニックマウスへ SARS-CoV の経鼻的感染を行った結果、いずれのラインでも 3 日目に神経症状を呈し、肺および脳で高力価のウイルス増殖を伴い 4 から 5 日目に斃死し、SARS-CoV に高感受性であることが明らかになった。

D. 考察

SARS は、2003 年に中国で発生後、短期間の間に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。日本では幸い患者発生はなかったが、SARS-CoV の自然宿主が日本にも分布するキクガシラコウモリであると報告さ

れたことから、今後、輸入感染症としてだけでなく、国内の宿主動物を原因とする SARS 患者が発生する可能性を想定して対応することが必要である。SARS-CoV を扱っている海外の研究室で、実験室感染が相次ぎ、実験室感染した研究者からの二次感染による SARS 患者の死亡例もでた。

本研究では、安全にかつ迅速に行なえる SARS の実験室診断法を確立し、併せて精度向上を目指して、1) 不活化ウイルス抗原、組換えウイルス蛋白を用いた抗体検出法に関する研究、2) SARS-CoV を用いないウイルス中和抗体測定系に関する研究、3) SARS-CoV 遺伝子の検出法の改良と抗原迅速検出系の開発に関する研究、4) 類似の症状を呈する呼吸器感染症との迅速鑑別診断法の開発に関する研究、5) SARS 等の新興ウイルス感染症発生時に迅速にウイルスを検出同定する方法の開発に関する研究、6) SARS モデル動物の開発に関する研究を行ってきた。その結果、以下の成果を得た。

1) 組換えウイルス蛋白、ウイルス様粒子抗原を用いた抗体検出法に関する研究：

1. 組換えバキュロウイルスにより発現、精製した SARS-CoV N 蛋白を用いた IgG-ELISA を開発し、感度、精度が高いことを明らかにした。
2. 大腸菌発現系では、組換え N 蛋白の他のコロナウイルスとホモロジーの高い領域を除くことで、抗体測定の特異性を高めることに成功した。この抗原を用いた IgG-ELISA、IgM 捕獲 ELISA を開発した結果、不活化ウイルス抗原を用いた系よりも抗体検出の window 期間を短縮できた。さらに、より簡便な凝集 (PA) 法も開発した。

2) SARS-CoV を用いないウイルス中和抗体

測定系に関する研究：

1. 水疱口内炎ウイルス(VSV)のG蛋白欠損ウイルスにSARS-CoV S蛋白を取り込ませるVSV-pseudotypenによる非増殖性ウイルス感染系を確立した。この系を用いて、高感度、迅速なウイルス中和抗体測定法を確立した。さらに、VSV-pseudotypenの感染のマーカーとして分泌型アルカリフォスファターゼを発現する系も開発しハイスループットな測定系が構築できた。
2. VSVのG遺伝子をACE2に入換えた組換えVSVを作製し、SARS-CoV S蛋白発現細胞に感染する系を開発した。この系でもウイルス中和抗体測定が可能であった。

3) SARS-CoV遺伝子の検出法の改良と抗原迅速検出系の開発に関する研究

1. LAMP 法に用いるプライマーを検討したが、現行プライマーが最高感度であった。逆転写反応の阻害活性のあるラクトフェリンとヘパリンの影響が小さいものが1種みつかった。また、反応溶液に RNase inhibitor を添加することにより RNase の影響抑制に有効であった。簡易前処理後の検体から RT-LAMP 反応を行い迅速化できることを明らかにした。
2. SARS-CoV の単クローン抗体を作製し、イムノクロマトグラフィー法による SARS-CoV 抗原検出系を検討した結果、N 蛋白特異的単クローン抗体を用いたサンドイッチ系が高感度であった。

4) 鑑別診断法の開発に関する研究

類似症状を呈する呼吸器感染症との迅速鑑別診断法に関しては、A 型インフルエンザウイルスとヒトコロナウイルス 229E に関しては極めて高感度の LAMP 法が確立できた。臨床検体を用いてインフルエンザウイルス検出 RT-LAMP 法を評価した結果、市販の

イムノクロマトキットより高感度に検出できた。

5) SARS 等の新興ウイルス感染症発生時の、迅速ウイルス同定法の開発に関する研究：

1. Representational difference analysis(RDA) 法を改良することにより、特異的プライマーを用いずに SARS-CoV 遺伝子が検出できた。
2. Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法を開発した。RDV 法では、未知のウイルス遺伝子を増幅し直接遺伝子配列情報を得ることができると、SARS 等の新興ウイルス感染症発生時に迅速に病原ウイルスの同定が可能になる。この方法では、遺伝子組換えを行わないため特に新興感染症発生時の初期対応上極めて有効な方法となる。

6) SARS モデル動物の開発に関する研究

1. SARS-CoV 感染小動物モデル系 (1):ラットで 10 代継代した SARS-CoV は、S 蛋白の ACE2 結合領域にアミノ酸の置換が生じ、ラットでのウイルス増殖および病変形成の増加が認められた。特に加齢動物では、肺水腫等の SARS 様症状を呈した。
2. SARS-CoV 感染小動物モデル系 (2):マウスで継代した SARS-CoV を加齢動物に感染することにより、肺水腫等の SARS 様症状を呈し、致死率 30-50%となる系を確立した。
3. SARS-CoV 感染小動物モデル系 (3):ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは肺と脳での高い SARS-CoV 増殖を伴う致死的な感染をおこした。
4. SARS-CoV 感染サル系：気管内感染カニクイサルの接種後 7 日目の肺、肺門リン

パ節の他、脾、腸間膜リンパ節および胃から直腸におよぶ腸管から感染性ウイルスあるいはウイルスゲノムが検出され、開発した診断システムを統括的に評価する際のサンプルとして有効利用できた。

これらの研究成果により、SARS の検査法の精度向上及び迅速化ができた。また、SARS-CoV を使用しないためより安全に検査を行う体制が確立された。今後 SARS 患者が発生した場合に、より迅速かつ的確に検査を行うことができる。

E. 結論

SARS-CoV の培養系を使用しない血清診断系の開発により、実験室感染のリスクを回避できる。また、迅速に抗体測定が可能であり、抗体検出の window 期間を短縮できた。迅速にウイルス抗原を検出するイムノクロマト法が開発された。RT-LAMP 法をより簡便に迅速化することができた。また、類似初期症状を呈する感染症との鑑別診断用 LAMP 法も開発され、インフルエンザ用 RT-LAMP 法の有用性を臨床検体を用いて評価した。感染動物モデル系で得られる材料を用いて、今後、より良い検査法が開発された場合に、その精度・感度検定が可能となった。また、齧歯類に馴化した SARS-CoV によるラット、マウスでの SARS 発症モデル系が確立された。ヒト ACE2 トランスジェニックマウスは、SARS-CoV に高感受性であることが明らかになった。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet,

Shigeru Morikawa, and Kouichi Morita: Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein as Antigen in a Novel Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Clin Vac Immunol*, 14, 146-149, 2007

2. Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Arch Virol.* in press
3. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, and Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(2): 322-4, 2007
4. 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, Peiris JS, Chen PJ, 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
5. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats

- infected with SARS coronavirus. *J Virol.*, 81(4):1848-57, 2006
6. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, 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 (12) :1509-12, 2006
 7. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv Exp Med Biol.* 581: 593-6, 2006
 8. 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 JS, DeMello DE, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol.* 581:561-6, 2006
 9. Zamoto A, Taguchi F, Fukushi S, Morikawa S, Yamada YK. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. *Adv Exp Med Biol.* 581:519-22, 2006
 10. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. *Adv Exp Med Biol.* 581:515-80, 2006
 11. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS coronavirus spike protein. *Adv Exp Med Biol.* 581:293-6, 2006
 12. Matsuyama S, Ujike M, Ishii K, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv Exp Med Biol.* 581: 253-8, 2006
 13. Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirota K, Kurane I, Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(1):261-5, 2006
 14. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, 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(2):368-80, 2006
 15. Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46 (2) :236-43, 2006
 16. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection

- in Vero E6 cells. *FEBS Lett.* 2006; 580 (5):1417-24.
17. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H. Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol*, 78:954-963, 2006
 18. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes and Infection*, 8(12-13):2706-14, 2006
 19. Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. 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. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12, 848-854, 2005.
 20. Fukushi, S., T. Mizutani, M. Saijo, S. Matsuyama, N. Miyajima, F. Taguchi, S. Itamura, I. Kurane, and S. Morikawa. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol*, 86:2269-2274, 2005.
 21. Kitagawa Y., Tani H., Limn C-K., Matsunaga T., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses. *J. Virol*, 79: 3639-3652, 2005
 22. 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, Y., Furukawa, I., Yamada, K., Matsumoto, K., Kase, T., de Mello, D. E., Peiris, J.S.M., Chen, P-J., Yamamoto, N., Yoshinaka, Y., Nomura, T., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., Sakatani, M. The development of vaccines against SARS coronavirus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*, 23: 2269-2272. 2005
 23. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (35) :12543-7, 2005.
 24. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1741 (1-2) : 4-10, 2005
 25. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 66(2-3):159-63, 2005
 26. Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu- Yokota Y, Oshima 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, Takemori T.

- Immuno- logical detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis.* 58(2): 88-94, 2005
27. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, Morikawa S, Hayashi M. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 33(6):e65, 2005
 28. Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, 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 (2) :181-6, 2005.
 29. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *J. Med. Virol,* 75:130-136, 2005.
 30. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H. Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J. Virol,* 79 (5) : 2910-9, 2005
 31. Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol* 79 2847-2858 2005
 32. Mizitani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun,* 319 1228-1234. 2004
 33. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327 169-74. 2004
 34. Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 577(1-2): 187-92 2004
 35. Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, 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(10) 1423-30 2004
 36. Hong Thi Cam Thai, Mai Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Manmohan Parida, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J.Clin.Microbiol.* 42 1956-1961, 2004
 37. 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
38. 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(6) 1050-2. 2004
39. 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人 SARS診断法の開発とSARS検査の結果. *インフルエンザ (メディカルレビュー社)* 5 35-42 2004
40. 奥野良信 SARSを考慮した今冬のインフルエンザ対策について *Symex Journal* 26 106-113 2004
41. 森田公一 新型肺炎 (SARS) 健康な子ども 374 42-43 2004
42. 棚林 清、巽 正志、藤田 修、宇田晶彦、山田章雄 SARSコロナウイルスの安定性の検討 *感染症誌* 78 991-992 2004
2. 学会発表
学会発表
1. 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、松尾栄子、岡本 徹、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：HCVエンベロープ遺伝子を組み込んだ組換えVSV、第54回日本ウイルス学会学術集会・総会、名古屋、2006年11月19-21日
2. 松永朋子、谷 英樹、佐藤 薫、森石恆司、藤原晴彦、松浦善治：カイコ幼虫へ遺伝子導入可能な水疱性口内炎ウイルスベクターの開発、第54回日本ウイルス学会学術集会・総会、名古屋、2006年11月19-21日
3. Watanabe R, Maejima M, Fukushi S, Matsuyama S, Morikawa S, and Taguchi F. Cleavage of spike protein defines the entry pathway of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). *Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans*, 2006年12月、Singapore
4. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Harashima A, Sato Y, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, and Sata T. Animal models of severe acute respiratory syndrome using rodent-passaged SARS-CoV. *Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans*, 2006年12月、Singapore
5. Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S. Amino acid substitutions on S2 region responsible in enhancement of SARS-CoV infection to rat ACE2-expressing cells. *Keystone Symposia, Respiratory viruses of animals causing diseases in humans*, 2006年12月、Singapore
6. Mizutani, T., Fukushi, S., Kenri, T., Sasaki, Y., Endo, D., Zamoto, A., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S. Molecular mechanism of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*, 2006年6月 Kyoto, Japan
7. 渡邊理恵、前島雅美、福士秀悦、松山州徳、森川茂、田口文広. SARSコロナウイルス解裂性スパイク蛋白を持つpseudotypeウイルスの細胞内侵入帰国に関する研究. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月

8. 福士秀悦、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂. ラットACE2発現細胞で継代したSARS-CoVのS遺伝子変異. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
9. 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本綾、倉根一郎、森川茂. SARS-CoVとMycoplasma fermentansの共感染が細胞に及ぼす影響. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
10. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎. マウス、ラット馴化SARS-CoVを用いたSARS発症動物モデルの作製. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
11. 氏家誠、福士秀悦、森川茂、田口文広. SARS-CoVスパイク(S)蛋白質のCys-rich領域は細胞間融合及びウイルス細胞侵入活性に重要な働きを持つ. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
12. 座元綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、山田靖子. フェレットACE2とSARS-CoV S蛋白質の親和性の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
13. 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田恭子. SARS-CoV Spikeに対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 名古屋, 2006年11月
14. 池尻昌宏、西條政幸、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎. 6-クロロプリンを塩基とした核酸誘導体のSARS-CoV抑制作用. 第16回抗ウイルス科学療法研究会, 福島市, 2006年5月
15. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎. SARSコロナウイルス感染動物モデルにおける肺病変. 第95回日本病理学会総会 (2006年4月新宿)
16. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎. SARS発症動物モデルにおける肺病変. 第95回日本病理学会総会 (2007年3月大阪)
17. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻H5N1高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第10回日本ワクチン学会学術集会 平成18年10月21日-22日 大阪
18. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈織子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)経鼻ワクチンによる感染防御 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
19. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の感染抑制効果 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
20. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 ア

- ジュバント併用経鼻H5N1インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討
第54回日本ウイルス学会学術集会
平成18年11月19日-21日 名古屋
21. Hasegawa H, Ichinohe T, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A., Ami Y, Suzaki Y., Tamura S., Ninomiya A., Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M. Sata T., Kurata T., Intranasal immunization of H5N1
 22. Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 23. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 24. Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 25. 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
 26. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシュードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
 27. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
 28. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシュードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多
 29. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARSコロナウイルスの病原性と発症機序の解明. 第94回日本病理学会総会 (2005年4月 横浜)
 30. 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVの継代培養による変異ウイルスの出現. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
 31. 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウスとラットを用いたSARS-CoV感染モデルの作製. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
 32. 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARSコロナウイルスの組換え核蛋白を抗原としたELISA法の開発を評価. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
 33. 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2発