

重症肺炎の原因となるコロナウイルス感染症の動物モデル： SARS-CoV から SARS-CoV-2

永田典代¹岩田(吉河)奈織子¹長谷川秀樹²¹ 国立感染症研究所 感染病理部² 国立感染症研究所 インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター

(実験動物ニュース 2024 Vol. 73 No. 2, p. 44-51.)

※本総説の一部は令和3年の日本実験動物学会総会シンポジウム8および令和5年度維持会員懇談会で発表されたものである

1. はじめに

2019年末から中華人民共和国湖北省武漢市を発端とした新型コロナウイルス(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2)に関連した新型コロナウイルス(coronavirus diseases 2019: COVID-19)の発生が報告され[1, 2], ヒト-ヒトの感染が短期間で世界中に急速に拡大した。2020年1月には, 世界保健機関(World Health Organization: WHO)より「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」が宣言され, 3年3ヶ月後の2023年5月にその終了が発表された。本症は, 国内の感染症法では2020年2月1日に期限付きで指定感染症と定められ, 2021年2月13日には「新型インフルエンザ等感染症(いわゆる2類相当)」に位置付けられた後, 2023年5月8日より5類感染症に移行された。一方で, SARS-CoV-2の変異株はいまなお次々と出現しており, 2021年11月末に出現し急速に感染拡大したオミクロン株は, その出現以来, 遺伝的にも抗原的にも急速に進化しており, 2024年2月現在も多くの亜系統の流行が報告されている[3]。

この世界的なパンデミック対応において, 動物モデルは重要な役割を果たした。パンデミックの発生後, 2020年初頭にはWHOのR&D Blueprintによって, COVID-19 Animal ModelsのWHOワーキンググループが急遽招集された(novel Coronavirus, COVID-19 Animal Models WHO Working Group, WHO R&D Blueprint.)[4, 5]。世界各国から100名以上の動物モデル研究の専門家らが参加し, 機密性の高い, 迅速で惜しめない積極的な情報交換がおよそ2年間, 毎週あるいは隔週のオンライン会議によって続けられた。この国際的な連携活動は, SARS-CoV-2とその変異株に対する新規ワクチンや治療薬開発の加速化に貢献した[6]。

著者らは, 2003年に発生した従来の重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)や中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)の動物モデル研究に携わっていたこともあり, パンデミック当初から, 感染性ウイルスを扱う必要のある中和試験法の確立とin vivo実験系の立ち上げを行った。また, 前述のCOVID-19 Animal Models WHO Working Groupに参加し, 他国の研究グループによる動物試験の情報を参考にしながら, 新規ワクチン開発研究を円滑に進めるため国立感染症研究所(感染研)内の複数の部署と共にマウス, シリアンハムスター, サル, ネコ, フェレットを用いて順次, 感受性試験を行った[7]。一方で, SARS-CoV-2のいわゆるD614G株の国内分離株を使うことでマウス継代株の作出に成功し, 新規ワクチンの安全性評価系を構築した[8]。これらの研究の多くは, 以前のSARS-CoVに関する基盤的研究に基づくものであり, この一連の出来事によって, 新興・再興感染症対策における動物モデルの基盤的研究の重要性が再認識された。本稿では, まず, 私たちが行ってきた動物モデル研究の考え方について概説し, その後, SARSとMERSに関する動物モデル研究, そして, SARS-CoV-2感染症に対するワクチン開発における動物モデル研究の取り組みを紹介する。最後にCOVID-19対策における動物モデル研究の今後の課題についてまとめる。

2. コロナウイルス感染症のための動物モデル研究

感染症の動物モデル研究の主たる目的は, 病原体の病原性及び病態の解明, 新規診断法, ワクチン, 治療薬の開発のための評価系の確立である。私たちは, 新興感染症の動物モデル研究を次の4つのステップで行ってきた。①感染症の病態・病理を理解するためにヒト感染症例の病理像を明らかにする。②モ

デルに必要な実験動物を選択するために動物種ごとの原因病原体に対する感受性を検討する。③適切な動物を選んだ後、感染実験系を確立する。また、動物モデルの特性を理解し、評価系のためのプロトコルを確立する。④確立した評価系を用いて新規ワクチンや治療法の評価を行う。

感染症の特徴によって *in vivo* 試験において求められる評価は異なり、また、動物モデルによって評価法には限界がある。表 1 に COVID-19 に対するワクチン開発のための動物モデルにおける必要条件と対象動物をまとめた。

一方で、SARS-CoV-2 などのコロナウイルス感染実験に用いる動物種の選択には注意を要する。これにはコロナウイルス感染を決定する宿主因子について理解する必要がある [9]。コロナウイルスの感染は大きくわけて3つのステップからなる。まず、ウイルス表面のスパイクタンパク (S タンパク) と宿主細胞膜上のウイルスレセプター (SARS-CoV と SARS-CoV-2 の場合はアンジオテンシン変換酵素 2 : ACE2) との結合が生じ、次に複数の宿主プロテアーゼによる S タンパクの開裂がおきると、この領域が構造変化して膜融合がおき、その後、ゲノム RNA が細胞内へ侵入して感染が成立する。よって、ウイルスレセプターの役割をもつ宿主側の分子の形と局在、さらに宿主プロテアーゼの局在が宿主特異性と臓器指向性を決定していると理解されており [10-12]、コロナウイルス感染症の動物モデル開発の上で考慮すべき点となる。

3. SARS の動物モデル開発研究

2002-2003 年の冬季に発生した最初の SARS のアウトブレイク [13] に関連して、感染研は、WHO ネットワークによってフィリピンから患者の肺組織を入手した。その病理検索によって、SARS 患者の病理

像の本態はびまん性肺胞障害 (Diffuse alveolar damage : DAD) であること、また、比較的病変が進行していない肺胞野の肺胞上皮にウイルス感染細胞が検出されることが示された [14]。一方で、WHO や研究者同士のグローバルネットワークに基づき、香港 [15, 16] やドイツ [17] の研究者から SARS-CoV を分与頂いた後、2003 年夏には感染研にてカンクイザル、マウス、およびラットを用いて感受性試験を実施した。その結果、いずれの動物の肺においてもウイルスは感染、増殖したが、SARS 患者で報告されていたような明らかな SARS 発症は認められなかった。図 1 に示すように、カンクイザルの肺では一部、水腫を伴う急性肺炎像が認められたが、高い力価のウイルスを気管内投与した結果得られた組織像であり、病変は非常に限局したものであった [18]。そこで、若齢のラットとマウスを用いてウイルスの継代を行い、馴化を試みた。ウイルス液を動物に経鼻接種し、3 日目の肺洗浄液を回収、これを次の動物に経鼻接種することを 10 回繰り返した結果、感染力は上昇し一過性の体重減少が観察されるようになった。疫学的に「60 歳以上の高齢」は SARS 発症及び重症化のリスク因子とされていたことから、半年齢以上のラットやマウスを用いて評価したところ、明らかな発症及び致死性が認められた [19, 20]。

興味深いことに、マウス継代株は Th2 背景の BALB/c マウス (半年齢) に対して感染局所である肺において、サイトカインストームを誘導し、致死性である一方で Th1 背景の C57BL/6 マウスでは SARS の発症はみられなかった。さらに、ウイルス接種 3 時間後の半年齢 BALB/c マウスに Th1 サイトカインである IFN- γ を腹腔内投与すると、致死を免れた [20]。このことから、感染後の個体における Th1/Th2 反応のバランスは SARS 発症の有無に重要な要因である

表 1 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) ワクチン開発のための動物モデルにおける必要条件と候補となった実験動物

評価項目	動物モデルにおける必要条件	候補動物種
免疫原性 VACCINE IMMUNOGENICITY	ワクチン抗原に対する抗体誘導があること。 感染実験は不要。	マウス, ラット, マカク属サル
ワクチン安全性 VACCINE SAFETY	各プラットホームに必要な安全性試験が可能であること。感染実験は不要。	マウス, ラット
ワクチン効果 VACCINE EFFICACY	ワクチン免疫後のウイルス増殖の低下, 発症阻止, 重症化阻止あるいは致死阻止のいずれかの評価ができること。	ハムスター, フェレット, ネコ, マカク属サル, ウイルスレセプター遺伝子導入マウスなど
ワクチン関連病変増悪 VACCINE ASSOCIATED ENHANCED DISEASE (VAED)	ワクチン免疫後の動物に対して感染させた際に肺炎を引き起こすことが出来ること。	マウス, フェレット, マカク属サル, ネコ

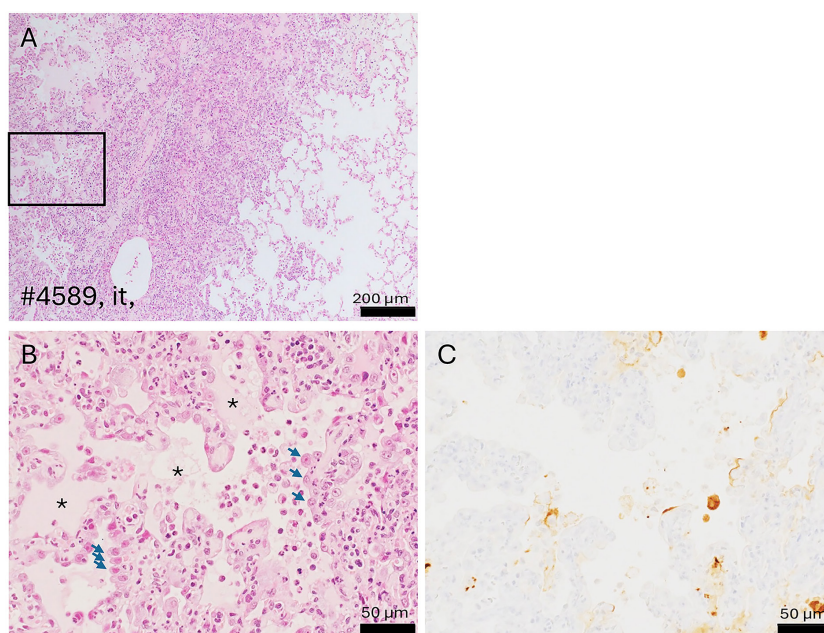


図1 SARS-CoV 感染カニクイザルの急性肺炎像

カニクイザル（雄、3 年齢、個体番号 #4589）に 10^8 TCID₅₀ の HKU39849 株を気管内カテーテルを用いて気管内接種（i.t.）した後、7 日目の肺組織像を示す [18]。(A) 主に下葉に局所的な水腫と炎症性病変が観察された。(B) A の枠線表示部位拡大。病変部の肺胞腔内は、マクロファージと好中球が主体の炎症性細胞と血漿成分 (*) で満たされていた。肺胞壁は II 型肺胞上皮（矢印）の再生像や炎症性細胞が認められた。(C) SARS-CoV 不活化粒子高度免疫ウサギ血清を用いた免疫組織化学法。ウイルス抗原陽性細胞は形態的に肺胞マクロファージと II 型肺胞上皮であった。

ことが示唆された。また、SARS の “immunopathology” を理解する上で有用なモデルと考えられた。このようにして確立した SARS 発症モデルを用いて、共同研究者らと SARS-CoV の病原性研究やワクチン・抗ウイルス薬開発を進めた [21–27]。さらに、SARS-CoV ワクチン開発にあたって懸念されていたワクチン関連疾患増悪 “Vaccine Associated Enhanced Disease : VAED”（後述）あるいは “Vaccine-associated enhanced respiratory disease : VAERD” [28–30] について、この動物モデルで研究することとした。

4. ワクチン関連疾患増悪（VAED）

RS ウイルス（respiratory syncytial virus）や麻疹ウイルスのワクチン開発において、ワクチンによる免疫賦与後の感染で、より重症化しやすいという VAED 現象が経験されていた [31]。1960 年代の RS ウイルスワクチンの臨床試験において、ワクチン接種後の小児が RS ウイルスに罹患後に重症化し、そのうち 2 名が死亡した [32]。死亡した小児の肺炎組織像は好酸球浸潤が顕著であったこと [33, 34]、RS ウイルス感染マウスモデルで同様の所見が得られたこと [35, 36] から好酸球浸潤を主体とする “eosinophilic immunopathology” が現在でも VAED の指標の一つとなっている。

動物のいくつかのコロナウイルス感染症において、既感染個体が再感染すると疾患と免疫病理 “immunopathology” が増強されることから、SARS-CoV ワクチン開発時に同様の懸念があった。また、水酸化アルミニウムアジュバントを添加した SARS ワクチンを投与し、その後 SARS-CoV 感染に供された動物が、RS ウイルス感染マウスモデルで観察された “eosinophilic immunopathology” と同様の所見を示したという報告により、この懸念はさらに強まっていた [28–30]。そこで、私たちも SARS-CoV マウス継代株を用いて VAED についての検証を行い、またその改善方法について検討した。その結果、水酸化アルミニウム添加不活化 SARS-CoV を免疫した BALB/c マウスの一部の個体がマウス継代株感染後に激しい好酸球浸潤を伴って致死した。免疫学的・病理学的検索の結果、感染・発症防御には不完全な中和抗体が誘導されたときに個体の免疫が Th2 に傾いていると、感染後に Th2 側の過剰な免疫応答が誘導され、肺炎が増悪することが示唆された。これに対し、Toll-like receptor アゴニストをアジュバントとして利用し、Th1 側の免疫を誘導することで Th1/Th2 応答は調整され、感染防御に十分な免疫を誘導し、VAED を回避できることが示された [26, 37]。

5. MERS 動物モデル開発研究

2012年にサウジアラビアで初めて確認された MERS は、MERS-CoV による呼吸器疾患である [38]。2023年12月までに WHO に報告された確定症例は 2609 件であり、そのうち 939 名が死亡例であった（致死率およそ 36%）[39, 40]。このウイルスは人獣共通感染症であり、ラクダ・ヒト間で感染・伝播している。COVID-19 の発生以来、症例数は減少したものの、現在も中東では持続的な発生が報告されている。

ウイルスのレセプターはジペプチジルペプチダーゼ 4 (Dipeptidyl Peptidase 4 : DPP4) であることがすぐに示された [41] が、MERS-CoV はマウス、ラット、ハムスター、フェレットの DPP4 に全く結合しないため、SARS-CoV と同様の動物モデルや馴化株の作出は不可能と推察された [42, 43]。これら小動物に対して感染実験が試みられたが、いずれも中和抗体の上昇は観察されなかった [43-46]。そこで、SARS 対策の際に共同研究を行っていた岡村匡史先生（国立国際医療研究センター）にご協力頂き、ヒト DPP4 遺伝子自体のプロモーターによってヒト DPP4 を発現するマウス (hDPP4-Tg マウス) を作出することで、感染モデル開発に成功した [47]。この感染モデルは致死性ではないが、MERS-CoV 感染による急性肺炎発症モデルであり、治療薬・ワクチン開発に適用可能である [48, 49]。当初、C57BL/6 背景の hDPP4-Tg であったが、前述の SARS-CoV 感染モデルの経験上、免疫背景が Th2 であることが病態の転帰に影響するのでは、という発想から、さらにはマウスであれば動物用バイオセーフティレベル 3 (ABSL3) 実験施設での取扱いが容易であることから、BALB/c への戻し交配をお願いし、現在では 2 系統の hDPP4-Tg を得ている。しかしながら、現状ではいずれの系統においても MERS-CoV 感染による致死モデルを私たちは得ていない。

海外からは CAG プロモーターを利用した hDPP4 Tg マウス [50] や、hDPP4 ノックインマウスと遺伝子組換えによるマウス馴化株を利用した致死モデルが報告されている [51, 52]。これらのモデルでは肺の他、脳あるいは血中など多臓器でウイルス増殖が観察される。この他、MERS-CoV 感受性動物としては、急性～重症感染モデルのマーマセット [53, 54] あるいは急性感染アカゲザルやウサギ [55, 56] の報告があるが、私たちは現在のところ、hDPP4 Tg マウスを用いた急性感染モデルにて研究を進めている。解析ツールが充実していること、また、ハンドリングの良さがマウスモデルの選択の理由である。

6. COVID-19 対策研究

SARS-CoV-2 の発見後、そのゲノム遺伝子情報から SARS-CoV と同様のウイルスレセプター、ACE2 を利用してヒトに感染することがすぐに明らかにされた [2, 12]。同時にマウスの ACE2 との結合親和性

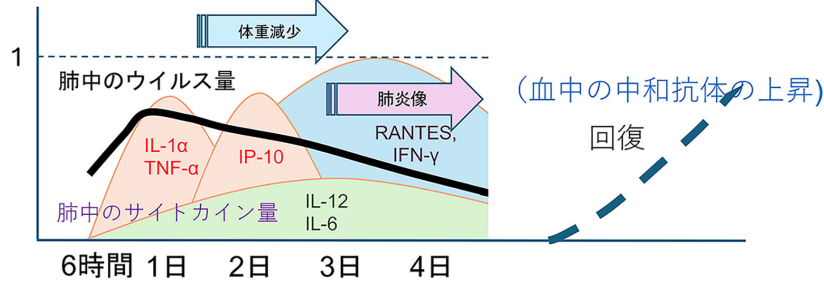
は非常に低いこともそのアミノ酸配列から予測され、感受性に非常に乏しいとされた [2]。私たちは前述のように、COVID-19 Animal Models WHO Working Group に参加し、他国の研究グループによる動物試験の情報を参考にしながら、非ヒト霊長類、ヒト ACE2 遺伝子導入マウス、あるいはネコ、フェレット等を用いた感染動物モデルの開発に順次、取り組んだ（日本医療研究開発機構 (AMED) 2019 年度研究課題「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のワクチン開発に関する研究」研究開発代表者長谷川秀樹）。海外では SARS-CoV 対策時に開発されたヒト ACE2 発現マウスが早々に活用され始めた一方で、当初、国内では入手困難であったこと（順番待ち）、また、近交系マウスモデルの利便性を鑑み、そのモデル開発を試みた。

幸いなことに、マウスに感染性がある SARS-CoV-2 の欧州系統由来株（いわゆる D614G 変異ウイルス : B.1 系統）が一株、見つかったことから、前述の SARS-CoV と同様の手順でマウス継代株を得ることが出来た [8]。In vivo 継代中、ウイルスの ORF1a 領域に 2 カ所、S 領域に 1 カ所 (Q498H)、N に 1 カ所アミノ酸置換を伴う変異が生じた。また、タンパクを使った結合能試験から、この S 領域の変異によってマウス ACE2 との結合能が上昇していることが確認された。このマウス継代株はマウスに体重減少と急性肺炎を引き起こすが、SARS-CoV のマウス継代株と同様、使用するマウスの週齢・性と系統によって病態が異なるという特徴がある (図 2)。

最初の評価では、4 週齢と半年齢の BALB/c マウスを用いたが、継代株を接種したマウスはいずれの群でも 2 日目以降に体重減少がみられ、4 週齢では 4 日目以降に全ての個体が回復した一方、半年齢マウスでは全ての個体が 3 日目、4 日目には呼吸困難のため瀕死あるいは致死となった。致死となった個体では、強い肺水腫を伴うびまん性肺胞傷害を示し、急性期の死亡例の特徴とされる硝子膜形成も確認できた。ウイルス抗原は細気管支上皮と肺胞に頻見され、電子顕微鏡下で感染初期はクラブ細胞が主たる感染・増殖の場であることが明らかとなった。

マウス継代株の 50% 致死ウイルス量を決定後、およそ 50LD₅₀ 量に相当するウイルス量で週齢差について検討し、11 週齢以下では一過性の体重減少を認めるものの回復した一方で、17 週齢以降では致死となることが明らかとなった。感染後の肺中のサイトカイン・ケモカイン発現量を比較すると 17 週齢以上の個体では瀕死期に肺局所の IL-6 や IL-1β の炎症性サイトカインの高値が観察され、一方で RANTES や IFN-γ など Th1 サイトカインが低値であった。この致死モデルに対し、ウイルス接種後、3 時間目に IFN-γ を腹腔内投与すると致死を免れた。また、同様の条件で Th1 背景である C57BL/6 に感染実験を行ったが、一過性の体重減少と回復の遅れが認められる

急性感染モデル/ BALB/c, 11週齢以下



致死モデル/ BALB/c, 17週齢以降

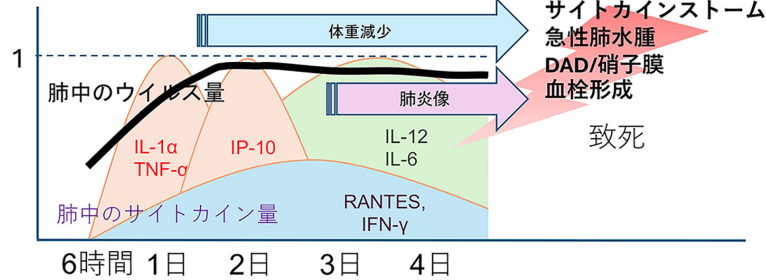


図2 SARS-CoV-2 マウス継代株を利用した急性感染モデルと致死モデルの評価系

急性感染モデル（上）では、11 週齢以下の BALB/c マウスを使用する。治療薬開発におけるウイルス増殖抑制効果等の薬効試験に有用である。また、急性肺炎後の後遺症についての研究への活用が期待される。致死モデル（下）は 17 週齢以降の BALB/c マウス（雌）を使用する。ワクチン開発や治療薬の重症化阻止の検討や VAED の評価に用いられる。また、サイトカインストームが誘導されるため、SARS-CoV-2 感染による重症急性肺炎の病態研究に有用である。

ものの、致死を免れた。このように、私たちの SARS-CoV-2 マウス継代株の感染モデルではウイルス性肺炎とその後の“immunopathology”の破綻による致死モデルを再現することができる。

COVID-19 ワクチン開発においても SARS や MERS に対するワクチン開発時と同様に、VAED が懸念された [57]。そこで、SARS-CoV-2 の組換えスパイク蛋白で免疫した BALB/c マウスに対して、マウス継代株を接種したところ、免疫応答は Th2 側に傾き、肺局所に“eosinophilic immunopathology”が観察された。さらに、Th1 誘導アジュバントをワクチンに添加することでその現象を改善することが出来た [8]。現在、この動物モデルは新規ワクチン・治療法の開発のための薬効試験やワクチン関連疾患増悪現象の評価に利用されている。国内開発の組換えタンパクワクチンにおいては、臨床治験に進む為の有効性を証明する前臨床試験に利用された。

その後、アルファ、ベータ、ガンマ、オミクロンを含むいくつかの SARS-CoV-2 の変異株で N501Y 置換が同定された。この N501Y 置換は野生型マウスの ACE2 に対する結合能を有し、マウスに対する感染性を発揮した。よって、これらの株は、マウスやウイルスを事前に遺伝子改変することなく、SARS-

CoV-2 自然感染モデルとして利用できる。ただし、感染後の表現型としては比較的軽度なものが多く、実際の研究への応用は現状、限られている。

7. COVID-19 研究における動物モデル研究の今後の課題

最後に COVID-19 研究における動物モデルの役割と今後の課題についてまとめる。COVID-19 パンデミック当初、治療法と予防法開発に必要な動物モデルの選択のため、各種動物モデルの感受性とその病態の検証が必要であった。その後、パンデミックが長期化し、さらに変異株が出現して以降、reverse zoonosis の可能性、伝播力の検証、疾患増悪、合併症、後遺症のメカニズムの解明、治療法、ワクチンの改良のために取り組むべき課題は多い。変異株についてはその病原性、免疫原性、ワクチン効果の検証あるいは宿主域の変化の継続的な監視が必要となっている。レセプター結合領域の複数の変異によって、ヒトをはじめとした各種動物に対する感染性や病原性に変化が生じている。変異株の病原性比較に関しては、各種動物モデルの妥当性を考えつつ、複数の動物モデルを組み合わせながら進めていく必要がある。

8. おわりに

COVID-19の基本的な理解は、その病態も含め不十分な点がまだ多い。一方で変異株の出現と感染拡大とその長期化、さらにワクチン免疫によってSARS-CoV-2に対するヒトの免疫は多様化しCOVID-19対策の必要性は複雑化している。COVID-19のパンデミック当初に設置された動物モデル研究の専門家らの国際的なネットワークCOVID-19 Animal Models WHO Working Groupは、2023年始めにはCOVID-19に対する限定的・機密的な対応を解除し、WHO R&D Blueprintがリストしている優先されるべき疾患（COVID-19、クリミアコンゴ出血熱、エボラウイルスおよびマールブルグ病、ラッサ熱、MERSおよびSARS、ニパ及びヘニパウイルス病、リフトバレー熱、ジカ、“Disease X”）[58]へと対象を拡大させ、オープンかつ継続的な情報共有を行っている。すなわち、今回構築された国際的なネットワークは次の有事には迅速な対応に結びつくと期待されている。本稿では、重症肺炎の原因となるコロナウイルス感染症に対する治療法・予防法開発のための各種動物モデルに関するこれまでの我々の取り組みについて紹介した。今後の新型コロナウイルス感染症研究や来たるべき新興感染症の対策研究を考える際の一助となれば幸いである。

9. 謝辞

2003年のSARS対応から始まった3つの重症肺炎関連のコロナウイルス研究は、感染研内外の多くの共同研究者のご指導・ご協力をいただきました。また、所内の関連委員会・管理部門のご支援をいただきました。特に、当初からご指導いただいた、感染研の佐多徹太郎先生、森川茂先生、西條政幸先生、網康至先生、田口文広先生、田代真人先生、また、MERS動物モデル開発研究のためのTgマウス作製にご尽力いただいた国立国際医療研究センターの岡村匡史先生、そして鈴木忠樹先生をはじめ感染研感染病理部員、研究生、実習生と技術員の皆様に感謝いたします。

引用文献

- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382:727-33.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579:270-3.
- 国立感染症研究所. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 関連情報 2024 [Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/covid-19.html>]
- Munoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SGP, Gsell PS, Riveros-Balta AX, Albrecht RA, et al. Animal models for COVID-19. *Nature.* 2020;586:509-15.
- World Health Organization. WHO Working Group – Animal Models 2020 [Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/who-working-group-animal-models>.]
- Munoz-Fontela C, Widerspich L, Albrecht RA, Beer M, Carroll MW, de Wit E, et al. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models. *PLoS Pathog.* 2022;18:e1010161.
- 志和(須藤)希, 岩田(吉河)奈織子, 坂井祐介, 永田典代. COVID-19研究における動物モデルの役割. *Labio* 21. 2022;86:26-9.
- Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Sekizuka T, Sano K, Aina A, Hemmi T, et al. A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection. *Sci Adv.* 2022;8:eabh3827.
- Perlman S, Masters PS. Coronaviridae: The viruses and their replication. In: Howley PM, Knipe DM, editors. *Fields Virology*. 1. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2021. p. 410-48.
- Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol.* 2010;84:3134-46.
- Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:22311-22.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181:271-80 e8.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1967-76.
- Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Sato Y, Dizon F, Paladin FJ, et al. SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. *Jpn J Infect Dis.* 2003;56:139-41.
- Zeng FY, Chan CW, Chan MN, Chen JD, Chow KY, Hon CC, et al. The complete genome sequence of severe acute respiratory syndrome coronavirus strain HKU-39849 (HK-39). *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228:866-73.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003;361:1319-25.

17. Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, et al. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol.* 2003;84:2305-15.
18. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, et al. Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol.* 2007;88:403-14.
19. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, et al. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome (SARS) in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J Virol.* 2007;81:1848-57.
20. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, et al. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 2008;172:1625-37.
21. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, et al. Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 2008;52:118-27.
22. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, et al. Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiol Immunol.* 2009;53:75-82.
23. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol.* 2010;84:12658-64.
24. Haga S, Nagata N, Okamura T, Yamamoto N, Sata T, Yamamoto N, et al. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2010;85:551-5.
25. Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Taguchi F. Studies of severe acute respiratory syndrome coronavirus pathology in human cases and animal models. *Vet Pathol.* 2010;47:881-92.
26. Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, et al. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol.* 2014;88:8597-614.
27. Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J Virol.* 2019;93.
28. Deming D, Sheahan T, Heise M, Yount B, Davis N, Sims A, et al. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med.* 2006;3:e525.
29. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, et al. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol.* 2008;181:6337-48.
30. Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, Newman PC, Garron T, Atmar RL, et al. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One.* 2012;7:e35421.
31. Munoz FM, Cramer JP, Dekker CL, Dudley MZ, Graham BS, Gurwith M, et al. Vaccine-associated enhanced disease: Case definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine.* 2021.
32. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969;89:422-34.
33. Polack FP, Teng MN, L.Collins P, Prince GA, Exner M, Regele H, et al. A Role for Immune Complexes in Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. *J Exp Med.* 2002;196:859-65.
34. Olson MR, Varga SM. Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7:1239-55.
35. Connors M, Kulkarni AB, Firestone CY, Holmes KL, Morse HC, Sotnikov AV, et al. Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4+ T cells. *J Virol.* 1992;66:7444-51.
36. Connors M, Giese NA, Kulkarni AB, Firestone CY, Morse HC, Murphy BR. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol.* 1994;68:5321-5.

37. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med.* 2009;15:34-41.
38. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012;367:1814-20.
39. World_Health_Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) 2022 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)).]
40. World_Health_Organization_Eastern_Mediterranean_Region. Middle East respiratory syndrome 2023 Dec [Available from: <https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>.]
41. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature.* 2013;495:251-4.
42. van Doremalen N, Miazgowicz KL, Milne-Price S, Bushmaker T, Robertson S, Scott D, et al. Host species restriction of Middle East respiratory syndrome coronavirus through its receptor, dipeptidyl peptidase 4. *J Virol.* 2014;88:9220-32.
43. van Doremalen N, Munster VJ. Animal models of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antiviral Res.* 2015;122:28-38.
44. de Wit E, Prescott J, Baseler L, Bushmaker T, Thomas T, Lackemeyer MG, et al. The Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) does not replicate in Syrian hamsters. *PLoS One.* 2013;8:e69127.
45. Raj VS, Smits SL, Provacia LB, van den Brand JM, Wiersma L, Ouwendijk WJ, et al. Adenosine deaminase acts as a natural antagonist for dipeptidyl peptidase 4-mediated entry of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 2014;88:1834-8.
46. Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Fukuma A, Suzuki T, Takeda M, Tashiro M, et al. Non Susceptibility of Neonatal and Adult Rats against the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Jpn J Infect Dis.* 2016;69:510-6.
47. Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Kotani O, Sato H, Sekimukai H, et al. Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol.* 2019;93.
48. Abbas AT, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Tabll AA, Hassan AM, Iwata-Yoshikawa N, et al. Anti-S1 MERS-COV IgY Specific Antibodies Decreases Lung Inflammation and Viral Antigen Positive Cells in the Human Transgenic Mouse Model. *Vaccines (Basel).* 2020;8.
49. El-Kafrawy SA, Abbas AT, Sohrab SS, Tabll AA, Hassan AM, Iwata-Yoshikawa N, et al. Immunotherapeutic Efficacy of IgY Antibodies Targeting the Full-Length Spike Protein in an Animal Model of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14.
50. Agrawal AS, Garron T, Tao X, Peng BH, Wakamiya M, Chan TS, et al. Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. *J Virol.* 2015;89:3659-70.
51. Li K, Wohlford-Lenane CL, Channappanavar R, Park JE, Earnest JT, Bair TB, et al. Mouse-adapted MERS coronavirus causes lethal lung disease in human DPP4 knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E3119-E28.
52. Gutierrez-Alvarez J, Wang L, Fernandez-Delgado R, Li K, McCray PB, Jr., Perlman S, et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Gene 5 Modulates Pathogenesis in Mice. *J Virol.* 2021;95.
53. Falzarano D, de Wit E, Feldmann F, Rasmussen AL, Okumura A, Peng X, et al. Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004250.
54. Nelson M, O'Brien LM, Davies C, Keyser E, Butcher W, Smither SJ, et al. Comparison of Experimental Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Acquired by Three Individual Routes of Infection in the Common Marmoset. *J Virol.* 2022;96:e0173921.
55. Haagmans BL, van den Brand JM, Provacia LB, Raj VS, Stittelaar KJ, Getu S, et al. Asymptomatic Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in rabbits. *J Virol.* 2015;89:6131-5.
56. Houser KV, Broadbent AJ, Gretebeck L, Vogel L, Lamirande EW, Sutton T, et al. Enhanced inflammation in New Zealand white rabbits when MERS-CoV reinfection occurs in the absence of neutralizing antibody. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006565.
57. Lambert PH, Ambrosino DM, Andersen SR, Baric RS, Black SB, Chen RT, et al. Consensus summary report for CEPI/BC March 12-13, 2020 meeting: Assessment of risk of disease enhancement with COVID-19 vaccines. *Vaccine.* 2020;38:4783-91.
58. World_Health_Organization. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts [Available from: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>.]