

猫伝染性腹膜炎（FIP）に対する  
抗ウイルス薬および抗 TNF 薬の開発

土岐 朋義

平成 27 年度

Development of anti-viral and anti-TNF drug for  
treatment of feline infectious peritonitis (FIP).

Tomoyoshi Doki

2015

## 目次

第1章	緒言	1
第2章	I型およびII型猫伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)の 感染を抑制するS1ドメイン由来ペプチドの同定	9
	緒論	10
	材料および方法	12
	1. ペプチド合成	12
	2. 細胞	12
	3. モノクローナル抗体(mAb)	12
	4. ウイルス	13
	5. FIPV感染におけるポリカチオンおよびポリアニオンの 影響	13
	6. ペプチドによるブラック抑制試験	14
	7. ペプチドがFIPVの感染を抑制する条件の検討	15
	8. Flow cytometric analysis	15
	9. Protein sequence	16
	10. Statistical analysis	16
	実験成績	17
	1. I型FIPV感染に対するポリアニオンおよびポリカチオン の影響	17

2. FIPV の感染を抑制する I 型 FIPV S protein 由来ペプチドの 検索	17
3. ペプチドが FIPV の感染を抑制する条件の検討	18
4. ペプチドの I 型 FIPV、II 型 FIPV、猫ヘルペスウイルス (FHV)、 および猫カリシウイルス (FCV) に対する抗ウイルス効果	19
5. ペプチドの fcwf-4 細胞に対する FIPV 吸着抑制効果	19
考察	21
小括	26
図表	
 第 3 章	
猫伝染性腹膜炎 (FIP) に対する治療を目的とした 抗 fTNF- $\alpha$ モノクローナル抗体の開発	28
緒論	29
材料と方法	32
1. 細胞およびウイルス	32
2. 抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製	32
3. Enzyme-linked immunosorbent assay	33
4. mAb のクラスおよびサブクラスの決定	34
5. mAb の精製	34
6. Western immunoblotting assay	34
7. マウス線維肉腫細胞 (WEHI-164 細胞) を用いた精製 抗 fTNF- $\alpha$ mAb の fTNF- $\alpha$ に対する中和活性の測定	35
8. 供試動物	36
9. 好中球の分離	36

10.	組換え fTNF-alpha と共培養した FIP 発症猫好中球の 生存率に対する抗 fTNF-alpha mAb の影響	37
11.	RNA の抽出および cDNA 合成	37
12.	PCR による猫 GAPDH および fAPN mRNA の定量	37
13.	猫肺胞マクロファージの分離	38
14.	組換え fTNF-alpha と共培養した猫肺胞マクロファージ における fAPN mRNA の発現に対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果	39
15.	TNF-alpha が猫 T リンパ球株化細胞に誘導するアポトー シスに対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果	39
16.	Statistical analysis	39
	実験成績	40
1.	抗 fTNF-alpha mAb の作製と mAb の fTNF-alpha に対する 反応性	40
2.	fTNF-alpha に対する抗 fTNF-alpha mAb の中和活性	40
3.	fTNF-alpha と共培養した FIP 発症猫好中球の生存率に対する 抗 fTNF-alpha mAb の影響	41
4.	fTNF-alpha と共培養した猫肺胞マクロファージにおける fAPN mRNA の発現に対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果	41
5.	TNF-alpha が T リンパ球株化細胞に誘導するアポトーシス に対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果	42
	考察	43
	小括	47
	図表	

第4章	抗 fTNF- $\alpha$ モノクローナル抗体の FIP に対する 治療効果	49
緒論		50
材料および方法		52
1.	細胞およびウイルス	52
2.	mAb	52
3.	mAb 2-4 の精製	53
4.	ウイルス接種と mAb 2-4 投与計画	53
5.	血漿の採取	54
6.	血漿 $\alpha$ 1-酸性糖蛋白質 (AGP) 濃度の測定	54
7.	血漿 vascular endothelial growth factor (VEGF)濃度 の測定	54
8.	Flow cytometry analysis を用いた T リンパ球数の測定	54
9.	Statistical analysis	55
実験成績		56
1.	抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫の血漿 AGP および VEGF 濃度の変化	56
2.	抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫の好中球数 および白血球百分比における好中球割合の変化	56
3.	抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫のリンパ球数 および T リンパ球数の変化	57
4.	抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫における 体温、体重、臨床症状および生存率の変化	58
考察		60
小括		63

図表

第 5 章	抗 fTNF-alpha mAb 2-4 の mouse-feline chimeric mAb への改変	64
緒論		65
材料および方法		67
1. 細胞		67
2. mAb 2-4 可変領域および猫イムノグロブリン定常領域の クローニング		67
3. Chimeric mAb 2-4 発現ベクターの構築と発現株の作製		68
4. mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の精製		68
5. Western immunoblotting assay		69
6. マウス線維肉腫細胞 (WEHI-164 細胞) を用いた精製 mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に 対する中和活性の測定		70
7. 猫に対する反復投与試験		70
8. mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 を投与した猫の血清 と反応させた mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 の中和 活性の変化		71
実験成績		72
1. mAb 2-4 可変領域および猫イムノグロブリン定常領域の クローニング		72
2. 精製 mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の western blot analysis		72
3. mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に		

対する中和活性	73
4. 反復投与試験による副反応および mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 を投与した猫の血清と反応させた mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 の中和活性の変化	74
考察	76
小活	80
図表	
第 6 章 総括	82
謝辞	87
参考文献	88



## 第 1 章

### 緒言

猫伝染性腹膜炎 (feline infectious peritonitis; FIP) は、1963年に米国の Holzworth によって猫における慢性線維素性腹膜炎として初めて報告された [39]。その後、1966年に Wolfe と Griesemer はこの疾病が FIP ウイルス (FIPV) 感染を原因としたウイルス性伝染性疾患であることを確認し、FIP と命名した [99]。

FIP は壊死と化膿性肉芽腫性炎を伴う免疫複合体介在性血管炎を特徴とする慢性・進行性の疾患であり、発症した猫のほとんどが死亡する極めて致死率の高い疾患である。一部の血統種および近親交配により生まれた猫、そして若齢猫は FIP を発症しやすいことが報告されている [1]。FIP は腹水、胸水、そして心嚢水の貯留が認められる滲出型 (wet form) と多発性化膿性肉芽腫形成を特徴とする非滲出型 (dry form) の 2 つの病型に分類される。これら 2 つの病型は完全に独立して存在することは稀であり、しばしば混在する [34]。猫がどちらの病型に進行するかは FIPV に対する細胞性免疫の強さに依存しており、細胞性免疫応答が弱い場合には滲出型を発症すると考えられている [1, 34, 63]。FIPV 発症猫においては初期に発熱、沈うつ、食欲不振および体重減少などの臨床所見が認められる。また、好中球増多症、リンパ球減少症、ガンマグロブリンの上昇を伴う全血清蛋白質の上昇、アルブミン/グロブリン比の低下、高ビリルビン血症、血清 alpha-1 酸性糖蛋白質 (AGP) の上昇などの血液生化学的所見が認められる [1, 17, 61, 62]。症状が進行するとともに、胸水や腹水の貯留、呼吸困難、ブドウ膜炎、神経症状および皮膚病変が認められ、やがて死に至る [1]。

FIPV は *Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae* に分類される猫コロナウイルス (feline coronavirus; FCoV) に所属する [18]。FCoV は抗原性および遺伝子の特性から犬コロナウイルスや豚伝染性胃腸炎ウイルスと共に alphacoronavirus に分類される。FCoV は直径が約 100~150nm の巨大な球形ウイルスで、エンベロープを有する。構造蛋白質として nucleocapsid (N) 蛋白質、membrane (M) 蛋白質、spike (S) 蛋白質、envelope (E) 蛋白質が報告されている [46, 59]。FCoV のウイルスゲノムは約 29kbp のプラス鎖一本鎖の RNA からなる。その遺伝子構造は 5' 末端から、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼや 3C-like protease などの 16 種類の非構造蛋白質をコードする open reading frame (ORF) 1a および 1b、S 蛋白質をコードする S 遺伝子、ORF 3a、3b および 3c、E 蛋白質をコードする E 遺伝子、M 蛋白質をコードする M 遺伝子、N 蛋白質をコードする N 遺伝子、ORF 7a および 7b、そして 3' 末端の poly A tail からなる [18]。

FCoV は S 蛋白質に対するモノクローナル抗体 (mAb) を使用した抗原性解析と S 遺伝子の遺伝子解析の結果から I 型と II 型の 2 つの血清型に分けられる [29, 55, 56]。さらに FCoV は、猫に対して FIP の起病性を有する FIPV と有さない猫腸コロナウイルス (feline enteric corona ウイルス; FECV) の 2 つの生物型に分類される。即ち、FCoV は I 型の FIPV および FECV と II 型の FIPV と FECV に分類される。FECV は通常、猫に対して無起病性であるかまたは軽い腸炎を起こすのみである [1]。FIPV と FECV は血清学的に区別することができず、相違点は猫に対する病原性のみである。Stoddart と Scott は FIPV と FECV の猫に対する病原性の違い

は、マクロファージへの感染性の違いと関連することを報告した [84]。FIPV は主に単球・マクロファージで増殖し、FECV は主に腸の上皮細胞で増殖すると考えられている [66]。FECV と FIPV のトロピズムの差異については遺伝子の変異が関係する可能性が示唆されている。ORF 3c 遺伝子は FECV においては保存されているが、FIPV では欠損または変異が認められるという報告がある [8, 69]。構造蛋白質である S 蛋白質においても、FECV に保存されている furin プロテアーゼ開裂部位の変異および fusion ペプチド上におけるアミノ酸残基の変異が FIPV の病原性にそれぞれ関与していることが示唆されている [47, 69]。しかし、FECV と FIPV を明らかに判別できる遺伝子の変異領域は特定されていない。近年では FCoV を FECV と FIPV の 2 つの生物型に分類するのではなく、FCoV には無起病性の FCoV から強病原性の FCoV (FIPV) と幅広い病原性のウイルスが存在する可能性も提唱されている [1]。

II 型 FCoV はウイルスレセプターとして猫アミノペプチダーゼ N (fAPN) を利用している。一方、I 型 FCoV のウイルスレセプターについては今のところ同定されていない。Tresnan らは I 型 FCoV のウイルスレセプターも II 型 FCoV と同様に fAPN であると報告した [92]。しかし、Hohdatsu らは fAPN を認識する mAb は II 型 FCoV の株化細胞への感染を抑制するが I 型 FCoV の感染は抑制しないことを報告した [26]。最近、fDC-SIGN が I 型 FIPV のレセプターおよび II 型 FIPV のコレセプターとして機能する可能性が報告された [73, 95]。I 型 FCoV のウイルスレセプターについては更なる解析が望まれる。

FIPV が単球およびマクロファージに感染すると、それらの p38 MAPK 経路が活性化し、interleukin-1 beta (IL-1) および tumor necrosis factor (TNF) -alpha などの炎症性サイトカインが分泌される [71]。TNF-alpha は生体内において様々な炎症反応を惹起するサイトカインであり、免疫の誘導に重要な役割を果たしている。しかし、Takano らはウイルス感染マクロファージから産生される feline TNF (fTNF) -alpha が好中球増多症、リンパ球減少症、マクロファージにおける fAPN の発現量増加を誘導することを報告した [85-87]。即ち、FIP においては過剰に産生された fTNF-alpha がその病態悪化に深く関与する可能性が強く示唆される。

FCoV は世界中のイエネコにおいて広く蔓延している。I 型 FCoV と II 型 FCoV のうち、猫における感染率が高いのは I 型 FCoV である。日本、スイス、イギリスで行われた疫学調査の結果によると、野外の抗 FCoV 抗体陽性猫の約 80~90% が I 型 FCoV に対する抗体を保有することが確認されている [3, 28, 43, 80]。また、FIP 発症猫の約 70% が I 型 FIPV に起因することが報告されている。しかしながら、I 型 FCoV は II 型 FCoV と比較して株化細胞および単球、マクロファージでの増殖性に乏しく、特に I 型 FECV の組織培養による分離はこれまで成功していない。さらに、I 型 FCoV を猫に経口・経鼻接種してもほとんど FIP を発症しない [67]。これらの理由から、FIP および FIPV に関する研究は II 型 FCoV が用いられることが多い。

FIP に対する免疫応答において、T リンパ球を介した細胞性免疫 (Th1 活性) の誘導は非常に重要である [16, 64]。Th1 活性が

強く誘導された猫においては FIP の発症が阻止される。一方、Th1 活性がほとんど誘導されない場合、FIP を発症すると考えられている。この理由として、FIP 発症猫においては末梢血およびリンパ組織から Th1 活性の誘導に関与する T リンパ球が消失しており、FIPV に対して細胞性免疫が誘導されない可能性が示唆されている [86]。一方、FIP においては液性免疫 (Th2 活性) の誘導は無効であるかむしろ FIP を悪化させると考えられている。抗 FCoV 抗体陽性の猫、または抗 FCoV 抗体を受身免疫した猫に対して FIPV を接種すると、抗 FCoV 抗体が陰性の仔猫と比較して発症および死亡時期が早まることが報告されている [65]。即ち、FIPV では抗体介在性感染増強 (ADE) が認められる。ADE は抗体が結合したウイルスが抗体の Fc 部分とマクロファージ表面に存在する Fc レセプターを介してマクロファージに感染することで引き起こされる [15, 32, 60, 88, 98]。FIPV に対する mAb を用いた解析から、ADE エピトープは S 蛋白質に存在し、それは中和エピトープと同一であることが報告されている [32]。即ち、FIPV に対する中和抗体は ADE を誘導する。このことが、FIPV に対するワクチン開発を困難なものとしている。また、抗 FCoV 抗体は ADE の発現だけでなく血管炎の形成にも関わる。血中で形成されたウイルスと抗 FCoV 抗体の免疫複合体は周囲の小血管壁に沈着する。そこに補体が結合すると脈管組織が障害され、脈管炎や血栓形成をきたす。

これまで過去 40 年にわたって FIP に対する治療法が研究されてきた。抗ウイルス薬である核酸アナログのリバビリン、ビダラビンは *in vitro* において FIPV の複製を抑制するが、猫に対して毒性を示すので臨床応用されていない [1]。組換え猫インターフ

ェロン<sup>®</sup>は FIP 発症猫に対して生存期間を延長することが報告されている [37]。しかし、その後に行われたプラセボ群を設定した管理下の追実験の結果から FIP の治療に効果がないことが証明された [76]。Takano らは抗マalaria薬であるクロロキンを投与した FIP 発症猫において FIP の臨床症状が改善することを報告した [89]。しかし、クロロキンを高用量で連続投与した猫では肝酵素の上昇が認められる。即ち、クロロキンを FIP の治療に用いる際は他の薬剤と併用することでその副作用を軽減する必要がある。抗ウイルス薬のほかに、FIP における炎症および過剰な免疫反応の抑制を目的として免疫抑制剤の投与も試みられてきた。しかし、FIP に対して有意な治療効果を示した薬剤は報告されていない [1]。

以上のように、FIP に対する有効な治療法および治療薬は確立していない。そこで著者は、FIPV の感染様式および FIP の病態を踏まえて FIP の治療薬の開発を試みた。即ち、第 2 章において、抗ウイルス薬として応用可能な FIPV の感染を抑制する配列を有するペプチドを同定した。第 3 章では、FIP の病態悪化因子である fTNF- $\alpha$  に対する中和活性を有する mAb (抗 fTNF- $\alpha$  mAb) を作出し、抗 fTNF- $\alpha$  mAb が FIP の治療に有効か否かを *in vitro* で検討した。第 4 章では、第 3 章で樹立した fTNF- $\alpha$  を効率的に中和する mAb 2-4 を FIP 発症猫に投与して FIP の症状の緩和および生存率の改善が認められるか否かを調べた。第 4 章の結果から、mAb 2-4 は FIP の治療薬として有用となる可能性が強く示唆された。しかし、本抗体はマウス由来の抗体であり猫に対して異種の蛋白質である。即ち、feline anti-mouse antibody が

誘導されることで、mouse mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する反応性が低下する可能性が考えられた。そこで著者は第 5 章において、mouse mAb 2-4 の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させた mouse-feline chimeric mAb (chimeric mAb 2-4) の作製を試みた。以下にその実験成績と考察を記載した。



## 第 2 章

I 型および II 型猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の  
感染を抑制する S1 ドメイン由来ペプチドの同定

## 緒論

猫コロナウイルス (FCoV) の S 蛋白質は他のコロナウイルス (急性呼吸器症候群ウイルス、マウス肝炎ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス) の S 蛋白質との相同性からクラス I 融合蛋白質に分類されている [11, 59]。S 蛋白質は、ウイルスエンベロープ上に三量体として存在し、構造的および機能的に N 末端側の S1 領域と C 末端側の S2 領域に分けられる。N 末端側の S1 領域にはレセプター結合領域 (receptor binding domain、RBD)、中和エピトープ、および ADE エピトープが存在することが報告されている [14, 15, 27, 32, 33, 38, 60]。N 末端側の S2 領域には融合ペプチドが存在し、ウイルスエンベロープと細胞膜との膜融合を引き起こす。

過去 40 年にわたって FIP に対する治療法が研究されてきた [23]。様々な抗ウイルス薬、免疫賦活薬、そして免疫抑制剤が FIP の治療に用いられてきた。しかし、FIP に対して有意な治療効果を示した薬剤の報告はほとんどない。In vitro の実験系においては FCoV のウイルス複製を有意に抑制する薬剤が報告されている [7, 9, 36, 39, 88, 89]。近年、新しい抗ウイルス薬としてウイルス蛋白質のアミノ酸配列を基にしたペプチドが注目されている。それらのペプチドはウイルス蛋白質または細胞のレセプターと結合し、ウイルスの感染を阻害する。ヒト医学領域では HIV の感染を阻害する HIV 由来配列のペプチドが治療に用いられている [24]。このペプチドは HIV の融合蛋白質と特異的に結合し、融合蛋白質による細胞膜融合を阻害する。さらに日本脳炎ウイルス

(JEV)の RBD 由来配列を有するペプチドは細胞のウイルスレセプターと特異的に結合して JEV の感染を競合的に阻害することが報告されている [44, 45]。このように、ウイルス蛋白質由来配列のペプチドはウイルスおよびウイルスレセプターと結合してウイルスの感染を阻害することが明らかにされている。FIPV においても Liu らは FIPV 融合蛋白質由来ペプチドが抗ウイルス効果を有することを報告した [49]。一方、FIPV の RBD 由来ペプチドも抗ウイルス活性を有することが考えられるが、この点については未だに検討されていない。FIP において抗ウイルス効果を持つ RBD 由来ペプチドを同定できれば新しい抗 FIPV 薬として応用が可能かもしれない。

そこで著者は、I 型 FIPV KU-2 株の RBD が存在すると予想される S 蛋白質 S1 領域のアミノ酸配列を参考に、オーバーラッピングペプチドを合成した。また、これらのペプチドが I 型 FIPV の感染を抑制するか否かをブラック法を用いて調べた。さらに、これらのペプチドが II 型 FIPV に対しても感染を抑制するか否かも検討した。

## 材料および方法

### 1. ペプチド合成

I 型 FIPV KU-2 株 S1 領域由来配列を有する 30 種類のペプチドを Sigma- Aldrich (U.S.A.) に依頼して合成した (表 1)。ペプチドは 20-mer のフラグメントとし、それぞれ 10-mer ずつオーバーラップさせた。合成されたペプチドは 10 mM の濃度で 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、ストック溶液として  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。溶媒対照として用いた DMSO はメジウムでペプチドと等しい倍率で希釈して実験に用いた。

### 2. 細胞

猫胎仔由来の *Felis catus whole fetus-4* (fcwf-4) 細胞、猫腎臓由来の *Crandell feline kidney* (CrFK) 細胞 (ATCC CCL-94)、そしてブタ腎臓 (CPK) 細胞は Eagles' minimum essential medium に L-15 medium を 50%、ウシ胎仔血清を 10%、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。細胞は全て  $37^{\circ}\text{C}$  の湿潤条件下で  $\text{CO}_2$  濃度を 5% に設定して培養した。Fcwf-4 細胞はユトレヒト大学の Dr. M. C. Horzinek より、CPK 細胞は北里研究所よりそれぞれ分与を受けた。

### 3. モノクローナル抗体 (mAb)

mAb 5-6-2 (IgG1) および mAb F19-1 (IgG1) を実験に使用した。  
mAb 5-6-2 および mAb F19-1 は当研究室で樹立し、それぞれ FIPV  
の S 蛋白質および M 蛋白質を認識する抗体である [29, 30]。

#### 4. ウイルス

I 型 FIPV KU-2 株、Black 株、UCD-1 株、II 型 FIPV 79-1146  
株、TGEV To-163 株、CCoV 1-71 株、猫ヘルペスウイルス (FHV)  
C7301 株そして猫カリシウイルス (FCV) F4 株を実験に使用した。  
FIPV KU-2 株は当研究室で分離した。FIPV Black 株はフロリダ大  
学の Dr. J. K. Yamamoto から、FIPV UCD-1 株は カルフォルニア  
大学デービス校の Dr. N. C. Pedersen から、FIPV 79-1146 株 は  
ユトレヒト大学の Dr. M. C. Horzinek からそれぞれ分与を受け  
た。TGEV To-163 株は動物衛生研究所から、FHV C7301 株および  
FCV F4 株は東京大学の Dr. E. Takahashi よりそれぞれ分与を受  
けた。FIPV は fcwf-4 細胞、TGEV は CPK 細胞、FHV および FCV は  
CrFK 細胞でそれぞれ 2-3 回継代した。

#### 5. FIPV 感染におけるポリカチオンおよびポリアニオンの影響

ポリカチオンとして DEAE-dextran (GE Healthcare UK Ltd.,  
England)、polybrene (Sigma-Aldrich, U. S. A.)、および protamine  
(Sigma-Aldrich, U. S. A.) を用いた。ポリアニオンとしては  
Dextran sulfate (GE Healthcare UK Ltd., England) および heparin  
(Ajinomoto, Japan) を用いた。FIPV KU-2 株をポリカチオンまた  
はポリアニオンを溶解したメジウムで希釈した。6 穴プレートに  
シートした fcwf-4 細胞にウイルス液 (1000 pfu/ml) を 10  $\mu$  L

接種し、37℃で60分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をメジウムで洗浄し、ウシ胎子血清を2%、カルボキシメチルセルロースを1.5%加えた培地を細胞に重層した。細胞は2日間培養し、ホルマリン固定およびクリスタルバイオレット染色を施し、プラック数を計測した。

#### 6. ペプチドによるプラック抑制試験

ペプチドストック溶液はウシ胎仔血清を2%、DEAE-dextranを25  $\mu$ g/mL加えたメジウムで希釈した。希釈したペプチドを24穴プレートにシートしたfcwf-4細胞に90  $\mu$ L加え、室温で30分間感作させた。同時に溶媒対照として同じ倍率に希釈したDMSOを細胞に感作させた。感作させた細胞を洗浄せずに8000 pfu/mLに調整したウイルス液を10  $\mu$ L接種し、37°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を洗浄し、ウシ胎子血清を2%、カルボキシメチルセルロースを1.5%加えた培地を細胞に重層した。細胞は2日間培養し、ホルマリン固定およびクリスタルバイオレット染色を行いプラック数を計測した。プラック抑制率(%)は次の計算式により算出した：プラック抑制率(%) = { (ウイルスのみのwellのプラック数 - ペプチドまたはDMSOを含むwellのプラック数) / ウイルスのみのwellのプラック数 } x 100.

また、ポリカチオンの電荷がペプチドの感染抑制効果に対して影響を及ぼすか否かを調べるためにDEAE-dextran濃度を0、25、または250  $\mu$ g/mLに調整したメジウムを用いてプラック抑制試験を行った。

## 7. ペプチドが FIPV の感染を抑制する条件の検討

ペプチドの感染抑制効果を示す反応条件を検討するためにペプチドを処理した細胞を洗浄してからウイルスを接種した。細胞に希釈したペプチド (100  $\mu$  M) または 1% DMSO を接種し、室温で 30 分間反応させた。細胞を洗浄して DEAE-dextran 加メジウムを 90  $\mu$  l 細胞に加えた。続いて、そこに 8000 pfu/ml のウイルスを 10  $\mu$  l 接種した。それ以降の操作は前述と同様に行った。また、同時に、細胞への前感作をしなくてもペプチドが感染抑制効果を示すか否かも調べた。すなわち DEAE-dextran 加メジウムを室温で 30 分間静置した。メジウムを除去し、ペプチドまたは DMSO とウイルスの混合液を細胞に接種した。

## 8. Flow cytometric analysis

$5 \times 10^4$  cells にペプチド (100  $\mu$  M) と II 型 FIPV 79-1146 株 (MOI=40) の混合液を加え、4°C で 1 時間反応させた。対照として細胞に 1% DMSO とウイルスの混合液を加えた。NaN<sub>3</sub> を 0.1% 加えた氷冷メジウムで細胞を 3 回洗浄し、mAb 5-6-2 および mAb F19-1 と 4°C で 30 分間反応させた。細胞を洗浄し、fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated F(ab)'<sub>2</sub> of goat anti-mouse IgG antibody (MP Biomedicals, LLC-Cappel Products, U.S.A.) を 4°C で 30 分間反応させた。細胞を再度洗浄し、フローサイトメーター (Cytomics FC500, Beckman Coulter, U.S.A.) を用いて 5000 個の細胞の蛍光強度を測定した。蛍光強度の抑制率 (%) を次の式を用いて算出した： 蛍光強度抑制率 (%) = { (ウイルスのみのサンプルの平均蛍光強度 (mean fluorescein intensity、

MFI) - ペプチドまたは DMSO を含むサンプルの MFI) / ウイルスのみのサンプルの MFI } x 100.

#### 9. Protein sequence

コロナウイルスの S 蛋白質のアミノ酸配列は Genbank に登録されているものを引用した。それぞれの accession number は AAB47503.1 (I 型 FIPV KU-2 株)、AB088223.1 (Black 株)、AB088222.1 (UCD-1 株)、AGZ84516.1 (II 型 FIPV 79-1146 株)である。S 蛋白質全長のアミノ酸配列のアライメント比較は ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて行った。アライメント比較の結果を図 1 に示した。

#### 10. Statistical analysis

2 群から構成されるデータに対してはスチューデントの t 検定を用いて有意差検定を行った。2 群以上から構成されるデータに対しては Tukey-Kramer 法または Dunnett' s 法を用いて有意差検定をおこなった。具体的には、FIPV に対して感染抑制効果を示すペプチドの反応条件を検討した時のみ Tukey-Kramer 法を用いて解析した。この実験以外の他群間の有意差検定には Dunnett' s 法を用いて解析した。



## 実験成績

### 1. I 型 FIPV 感染に対するポリアニオンおよびポリカチオンの影響

I 型 FIPV 感染に対するポリアニオンおよびポリカチオンの影響について調べた。ポリアニオンである dextran sulfate および heparin を培養液に添加した場合、FIPV KU-2 株の感染効率が減少した(図 2)。一方、ポリカチオンである DEAE-dextran、polybrene、および protamine を培養液に添加した場合、FIPV KU-2 株の感染効率はポリカチオンの濃度上昇と共に著しく上昇した。

### 2. FIPV の感染を抑制する I 型 FIPV S protein 由来ペプチドの検索

RBD が存在すると予想される I 型 FIPV KU-2 株 S 蛋白質のアミノ酸配列を参考にオーバーラッピングペプチドを合成した。I 型 FIPV S 蛋白質由来ペプチドの homologous 株である FIPV KU-2 株に対する感染抑制効果をブラック法を用いて調べた。前述のポリカチオン添加による感染増強の結果を踏まえて、 $25 \mu\text{g/ml}$  の DEAE-dextran を含むメジウムを用いて実験を実施した。 $100 \mu\text{M}$  に希釈したペプチドを 24-well plate にシートした fcwf-4 cell に  $90 \mu\text{l}$  添加した後、室温で 30 分間反応させた。その後、細胞を洗浄せず  $80 \text{ pfu}/10 \mu\text{l}$  のウイルスを  $10 \mu\text{l}$  接種した。実験に使用した 30 個のペプチドのうち、I-S1-8、I-S1-9、I-S1-10、I-S1-16 および I-S1-22 が FIPV KU-2 株の感染を有意に減少させ

た(図 3A)。また、これらのペプチドは全て容量依存的に FIPV KU-2 株の感染を抑制した(図 3B)。

FIPV の感染を抑制したペプチド、特に I-S1-8、 I-S1-9、および I-S1-10 の等電点が酸性であったため、ペプチドがポリカチオン (DEAE-dextran) の効果を弱めることでウイルスの感染を抑制している可能性が考えられた。そこで、DEAE-dextran の濃度を変化させてペプチドの感染抑制効果を調べた(図 4)。I-S1-9 および I-S1-16 は DEAE-dextran の濃度に関わらずウイルスの感染を抑制した。一方、I-S1-8 と同様に等電点が低い I-S1-18 はどの濃度の DEAE-dextran においても感染抑制効果を示さなかった。

### 3. ペプチドが FIPV の感染を抑制する条件の検討

FIPV KU-2 株に対して感染抑制効果を示すペプチドの反応条件を検討した。ペプチドを細胞に反応させた後、細胞を洗浄してウイルスを接種したところ、I-S1-9、 I-S1-16、および I-S1-22 の感染抑制効果はいずれも有意に減少した(図 5)。また、あらかじめペプチドを細胞に反応させずにウイルスとペプチドを同時に接種したところ、いずれのペプチドにおいても 40%以上の抑制効果が認められた。特に I-S1-16 ではウイルス接種前にあらかじめペプチドを細胞に反応させた場合と同等の効果が得られた。

### 4. ペプチドの I 型 FIPV、II 型 FIPV、猫ヘルペスウイルス(FHV)、 および猫カリシウイルス (FCV) に対する抗ウイルス効果

I 型 FIPV KU-2 株に対して高い感染抑制効果が認められた I-S1-9 および I-S1-16 が、他の FIPV 株、FHV、そして FCV の感染

を抑制するか否かを調べた。I-S1-9 および I-S1-16 は I 型 FIPV UCD-1 株および Black 株の感染を有意に抑制した (図 6)。また、同様に II 型 FIPV 79-1146 株の感染も有意に抑制した。特に I-S1-9 は FIPV 79-1146 株に対しても FIPV KU-2 株と同程度の感染抑制効果を示した。一方、これらのペプチドの感染抑制効果は FHV C7301 株および FCV F4 株では認められなかった。

#### 5. ペプチドの fcwf-4 細胞に対する FIPV 吸着抑制効果

ペプチドがウイルスの吸着効率を減少させるか否かを flow cytometric analysis を用いて調べた。実験は最も感染抑制効果が高かった I-S1-9 を用いて行った。

ウイルスを吸着させていない fcwf-4 細胞の fluorescence intensity (FL1 Lin) のヒストグラムのピークは 420 であった。ウイルスを吸着させた fcwf-4 細胞の fluorescence intensity のヒストグラムのピークは 620 にシフトした (図 7A)。同様に、DMSO とウイルスの混合液を接種した fcwf-4 細胞のヒストグラムのピークも 575 にシフトした (図 7A)。一方、ウイルスと I-S1-9 の混合液を接種した場合、そのヒストグラムのピークは 470 であった (図 7B)。即ち、ウイルスと I-S1-9 の混合液を接種した場合のピークはウイルスのみ、またはウイルスと DMSO の混合液を接種した場合と比較して左にシフトした。

fcwf-4 細胞におけるウイルスの吸着の程度を mean fluorescence intensity (MFI) で評価した。即ち、ペプチドがウイルス吸着をどの程度抑制するかを計算した。I-S1-9 とウイルスの混合液を接種した fcwf-4 細胞では、ウイルスの吸着の程度は

DMSO とウイルスの混合液を接種した fcwf-4 細胞に吸着した場合と比較して有意に減少した (図 7C)。

## 考察

著者は、I 型 FIPV KU-2 株の S 蛋白質のアミノ酸配列を基にしてオーバーラッピングペプチドを合成した。それらのペプチドが I 型 FIPV および II 型 FIPV に対して感染抑制効果を有するかどうかを調べた。

I 型 FIPV は細胞での増殖性が悪い [31]。ペプチドの I 型 FIPV に対する感染抑制効果を評価するに当たり、まず、I 型 FIPV の感染効率を増加させる方法を検討した。即ち、ペプチドの I 型 FIPV に対する感染抑制効果を正しく評価するために、ポリカチオンおよびポリアニオンをウイルス希釈液に添加する方法を検討した。ポリカチオンを含むメジウムでウイルスを希釈してから fcwf-4 細胞に接種したところ、I 型 FIPV のプラック数はポリカチオンの濃度依存的に増加した。一方、ポリアニオンを含むメジウムでウイルスを希釈するとプラック数はポリアニオンの濃度依存的に減少した。ポリカチオンによりウイルスの感染効率が増加し、ポリアニオンにより感染効率が減少することは TGEV、MHV、および水疱性口炎ウイルス (VSV) など他のウイルスでも報告されている [6, 25, 57]。Beiley らは positive charge を持つポリカチオンはウイルス粒子と細胞表面の静電的相互作用を増加させ、ウイルス粒子と細胞の結合を容易にすると報告している [6]。今回の実験においても、ポリカチオンがウイルスと細胞表面の静電的相互作用を増加させ、I 型 FIPV の感染効率を上昇させたと考えられた。

30 種類のオーバーラッピングペプチドのうち、I-S1-8、I-S1-9、I-S1-10、I-S1-16、および I-S1-22 は I 型 FIPV KU-2 株の感染を有意に減少させた。これらペプチドの等電点は酸性であった。したがって、ペプチドの電荷が ポリカチオンの効果を弱めてプラック数を減少させた可能性が考えられた。しかし、I-S1-9 および I-S1-16 はポリカチオンの濃度に関わらず I 型 FIPV KU-2 株の感染を有意に抑制した。また、I-S1-9 と同様に等電点の低い I-S1-18 は感染抑制効果をまったく示さなかった。これらのことからペプチドのもつ電荷によらず、感染抑制効果を示したと考えられた。また I-S1-8 および I-S1-10 のアミノ酸配列は I-S1-9 のアミノ酸配列と一部オーバーラップしている。一方、I-S1-7 (I-S1-8 と一部オーバーラップ) および I-S1-11 (I-S1-10 と一部オーバーラップ) は感染抑制効果を示さなかった。この点を踏まえると、FIPV の感染を抑制する上で、I-S1-9 のアミノ酸配列が非常に重要であることが推察された。

今回の実験では RBD が存在すると予想される I 型 FIPV KU-2 株 S 蛋白質のアミノ酸配列を基にオーバーラッピングペプチドを作製した。これまでの研究から、FIPV の RBD は S1 領域に存在することが予想されている [12, 72, 74]。Li らは JEV の RBD 由来のペプチドが JEV の細胞への結合を競合的に阻害して感染を抑制することを示した [44, 45]。Reguera らは TGEV の RBD を報告しているが、I 型および II FIPV 感染を抑制した I-S1-9 および I-S1-16 の領域は、この TGEV の RBD と一致する領域である [74]。I-S1-9 を用いた fcwf-4 細胞への FIPV 吸着抑制試験では、ウイルスの fcwf-4 細胞への結合を減少させていた。この事実を踏まえると、

少なくとも I-S1-9 はウイルスの細胞への結合を競合的に阻害し、その結果 FIPV の感染効率が有意に減少した可能性が推察された。しかし、細胞に前感作した I-S1-9 および I-S1-16 の感染抑制効果はウイルス吸着前の細胞洗浄によって明らかに減少した。このことは、ペプチドが細胞のウイルスレセプターではなくウイルスの蛋白質と相互作用している可能性を示唆している。一方、図 5 の結果は、細胞表面のペプチド-ウイルスレセプター複合体の内化と細胞表面へのウイルスレセプターの再出現によっても説明が可能である。従って、今回これらのペプチドが細胞のウイルスレセプターとウイルスの S 蛋白質のどちらに結合して作用を示すのかという点については明らかにすることができなかった。これらペプチドの詳細な作用機序については今後のさらなる検討が必要であると考えられる。

今回の実験において特に高い感染抑制効果を示した I-S1-9 および I-S1-16 を用いて他の I 型 FIPV 株、II 型 FIPV、FHV、FCV に対する感染抑制効果を調べた。I-S1-9 は I 型 FIPV および II 型 FIPV の両方に対して 50%以上の有意な感染抑制効果を示した。一方、I-S1-16 は、実験に用いた全ての I 型 FIPV に対して 50%以上の感染抑制効果を示したが、II 型 FIPV に対する感染抑制効果は 50%未満であった。実験に用いたコロナウイルスの S 蛋白質のアミノ酸配列を比較したところ、I-S1-16 のアミノ酸配列は KU-2 以外の I 型 FIPV に対して 75-80%の identity と 90%の similarity を示した。一方、I-S1-16 のアミノ酸配列は II 型 FIPV に対しては 20%の identity と 30-35%の similarity しか示さなかった（図 1）即ち、I-S1-16 のアミノ酸配列は II 型 FIPV と相同

性が低いために、I 型 FIPV よりも感染抑制効果が低下したと考えられた。一方、I-S1-9 のアミノ酸配列は I 型 FIPV と II 型 FIPV の間でよく保存されていた。これらのことを踏まえると、I-S1-9 は FCoV に対して広範囲な抗ウイルス活性を有している可能性が示唆された。加えて、I 型および II 型 FIPV に対する効果の類似性を考えると、これら 2 種類のウイルスに対して共通のウイルスレセプターの結合領域が存在する可能性が考えられる。しかし、これまでの研究から I 型および II 型 FIPV に対してはそれぞれ異なるウイルスレセプターが存在すると考えられる [26]。この理由については今回の実験では明らかにできなかった。このことを解明するためには I 型 FIPV のウイルスレセプターを同定する必要がある。

FIPV は血清学的に I 型と II 型に分類されるが、どちらも猫に対して同じ FIP を引き起こす。2 つの FIPV は血清学的に交差しない [64, 80]。また、株化細胞での増殖性および猫に対する起病性は II 型 FIPV の方が高い。そのためこれまでの FIPV に対する研究および抗 FIPV 薬の研究は II 型 FIPV を用いて行われてきた。即ち、I 型 FIPV に対して有効な抗 FIPV 薬を検索した研究はほとんど実施されていない。野外では I 型 FIPV に感染した猫が多いという事実を踏まえると I 型 FIPV に対して有効な抗 FIPV 薬を作製することは獣医臨床において重要である [3, 28, 43, 80]。我々はコロナウイルス特異的に感染抑制効果を示すペプチドを同定した。I-S1-9 および I-S1-16 は全ての I 型 FIPV に対して高い感染抑制効果を示し、これらの peptide は野外株に対しても感染抑制効果を示す可能性が示唆された。また、I-S1-9 は I 型 FIPV



だけでなく、II 型 FIPV に対しても高い感染抑制効果を示しており、実際に抗 FIPV 薬として応用できる可能性が示唆された。

一般に、ペプチド製剤は血中半減期が短いことが知られている。血中半減期を延長する方法として polyethylene glycol による修飾が行われている [4, 58, 79]。また、Marastoni らは分子内で環状化したペプチドは血中および脳内の酵素に対して抵抗性を増すことを報告している [51]。さらに、ペプチドをアルブミンや免疫グロブリンの Fc 領域と融合させることで半減期を延長する方法も報告されている [5, 82, 100, 102]。今後、ペプチドを実際に猫に投与するために、これらの修飾方法が応用できるか否かを検討する必要がある。

## 小括

FIPVは猫科動物における致死性疾患であるFIPの原因ウイルスである。これまでに様々な抗ウイルス薬、免疫賦活薬、そして免疫抑制剤がFIPの治療に用いられてきた。しかし、FIPに対して有意な治療効果を示した薬剤の報告はほとんどない。近年、新しい抗ウイルス薬としてウイルス蛋白質のアミノ酸配列を基にしたペプチドが注目されており、実際に治療薬としても用いられている。FIPにおいても抗ウイルス効果を持つペプチドを同定できれば新しい抗FIPV薬として応用が可能であることが考えられた。そこで著者は、I型FIPV KU-2株のレセプター結合領域(RBD)が存在すると予想されるS蛋白質S1領域のアミノ酸配列を参考に、オーバーラッピングペプチドを合成した。さらに、これらのペプチドがI型FIPVの感染を抑制するか否かをブラック法を用いて調べた。ペプチドのI型FIPVに対する感染抑制効果を測定するに当たり、株化細胞における増殖能に乏しいI型FIPVの感染効率を増加させる方法を検討した。ポリカチオンを含むメジウムでウイルスを希釈することでI型FIPVの感染効率が増加したことから、以降の実験をポリカチオンを添加したメジウムを用いて行った。30種類のペプチドのうち、I-S1-8(S461-S480)、I-S1-9(S471-S490)、I-S1-10(S481-S500)、I-S1-16(S541-S560)およびI-S1-22(S601-S620)の5種類のペプチドがI型FIPV KU-2株の感染を有意に抑制した。中でもI-S1-9およびI-S1-16は特に高い感染抑制効果を示した。次に、2種類のペプチドの他のI

I 型 FIPV 株、II 型 FIPV 株、猫ヘルペスウイルス（FHV）、猫カリシウイルス（FCV）に対する感染抑制効果を調べた。I-S1-9 および I-S1-16 は I 型および II 型 FIPV 株に対して感染抑制効果を示したが、FHV および FCV に対しては感染抑制効果を示さなかった。今後、ペプチドの血中半減期を延長させる適切な修飾方法を検討していく必要がある。

表1 FIPV S蛋白質S1領域由来ペプチドのアミノ酸配列

Peptide no.	Amino acid sequence	Start position	Isoelectric point
I-S1-1	VTDFQPANNSVSHIPFGKTA	S 391	7.37
I-S1-2	VSHIPFGKTAHFCFANFSHS	S 401	8.41
I-S1-3	HFCFANFSHSIVSRQFLGIL	S 411	8.41
I-S1-4	IVSRQFLGILPPTVREFAFG	S 421	10.19
I-S1-5	PPTVREFAFGRDGSIFVNGY	S 431	6.46
I-S1-6	RDGSIFVNGYKYFSLPAIRS	S 441	9.99
I-S1-7	KYFSLPAIRSVNFSISSVEE	S 451	6.52
I-S1-8	VNFSISSVEEYGFWTIAYTN	S 461	3.48
I-S1-9	YGFWTIAYTNYTDVMVDVNG	S 471	3.27
I-S1-10	YTDVMVDVNGTAITRLFYCD	S 481	3.73
I-S1-11	TAITRLFYCDSPLNRIKCQQ	S 491	8.62
I-S1-12	SPLNRIKCQQLKHELDPGFY	S 501	8.34
I-S1-13	LKHELDPGFYSASMLVKKDL	S 511	7.34
I-S1-14	SASMLVKKDLPKTFVTMPQF	S 521	10.32
I-S1-15	PKTFVTMPQFYHWMNVTLHV	S 531	9.22
I-S1-16	YHWMNVTLHVVLNDTEKKYD	S 541	6.26
I-S1-17	VLNDTEKKYDIILAKAPELA	S 551	4.61
I-S1-18	IILAKAPELAALADVHFEIA	S 561	4.48
I-S1-19	ALADVHFEIAQANGSVTNVT	S 571	4.17
I-S1-20	QANGSVTNVTSLCVQARQLA	S 581	8.37
I-S1-21	SLCVQARQLALFYKYTSLQG	S 591	9.24
I-S1-22	LFYKYTSLQGLYTYSNLVEL	S 601	6.34
I-S1-23	LYTYSNLVELQNYDCPFSPQ	S 611	3.36
I-S1-24	QNYDCPFSPQQFNYYLQFET	S 621	3.36
I-S1-25	QFNYYLQFETLCFDVNPAVA	S 631	3.36
I-S1-26	LCFDVNPVAVAGCKWSLVHDV	S 641	5.24
I-S1-27	GCKWSLVHDVQWRTQFATIT	S 651	8.38
I-S1-28	QWRTQFATITVSYKHGSMIT	S 661	10.37
I-S1-29	VSYKHGSMITTHAKGHSWGF	S 671	10.16
I-S1-30	THAKGHSWGFQDTSVLVKDE	S 681	6.26

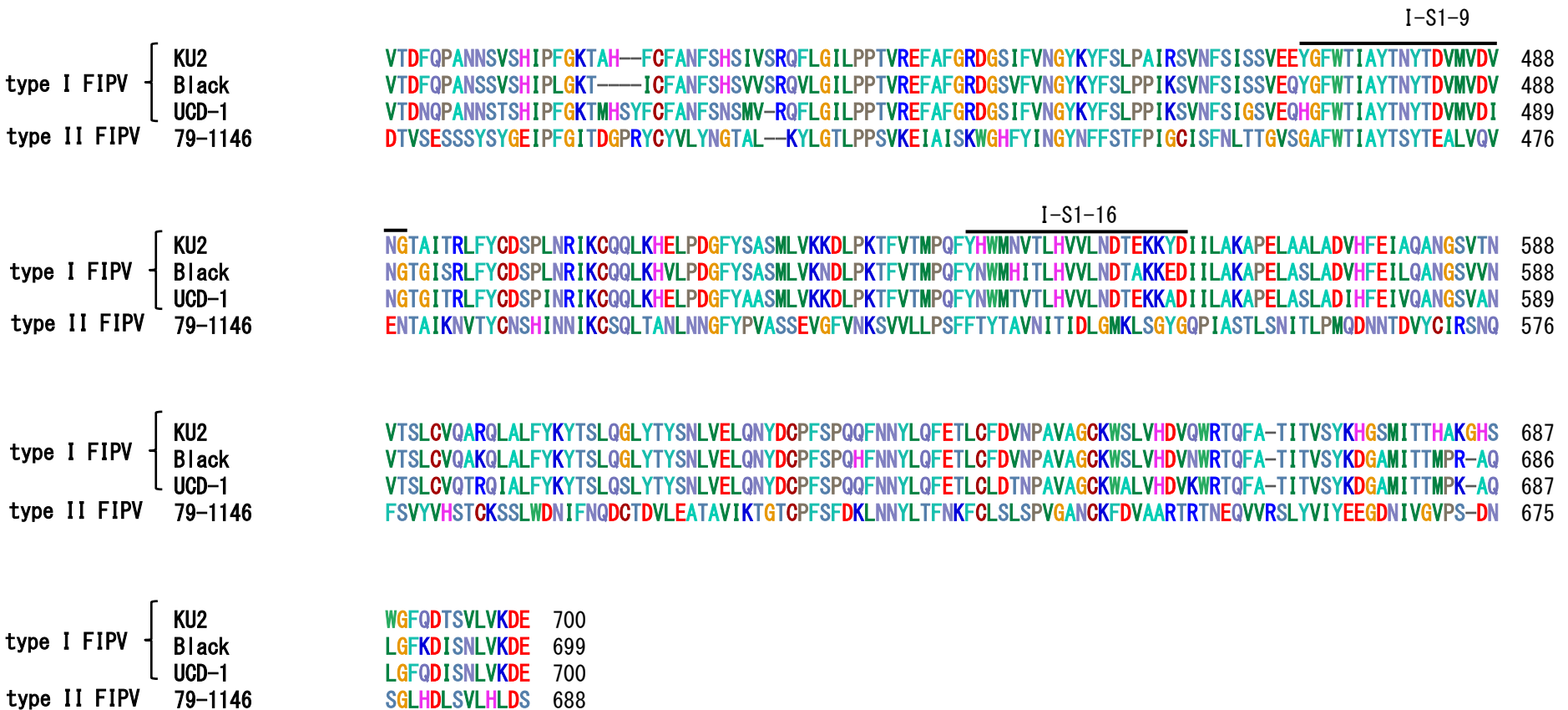


図1 FCoVのS蛋白質におけるアミノ酸配列と相同性

I型FIPV(KU-2株、Black株、UCD-1株)、II型FIPV 79-1146株のS蛋白質におけるアミノ酸配列のアライメント比較をClustalWを用いて行った。

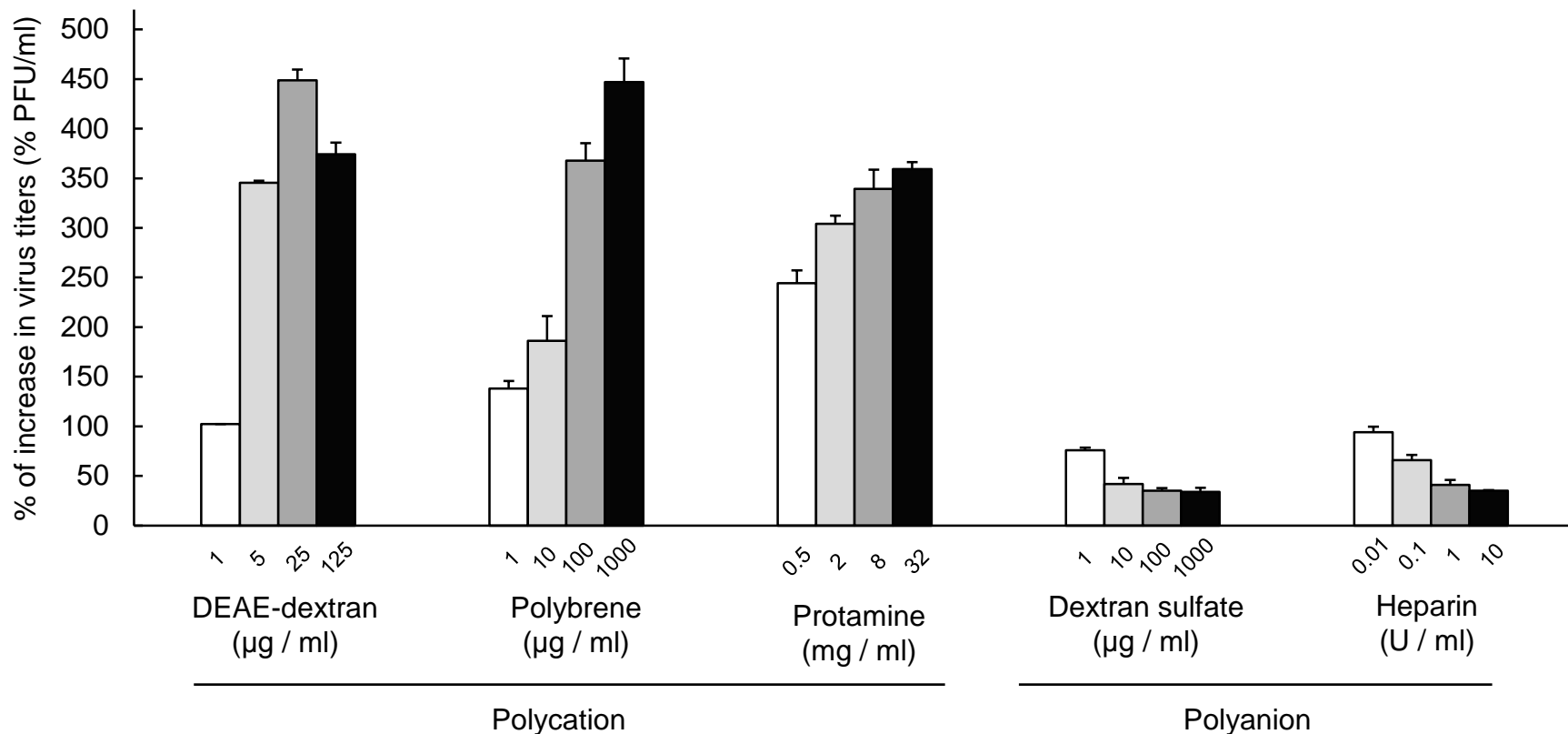


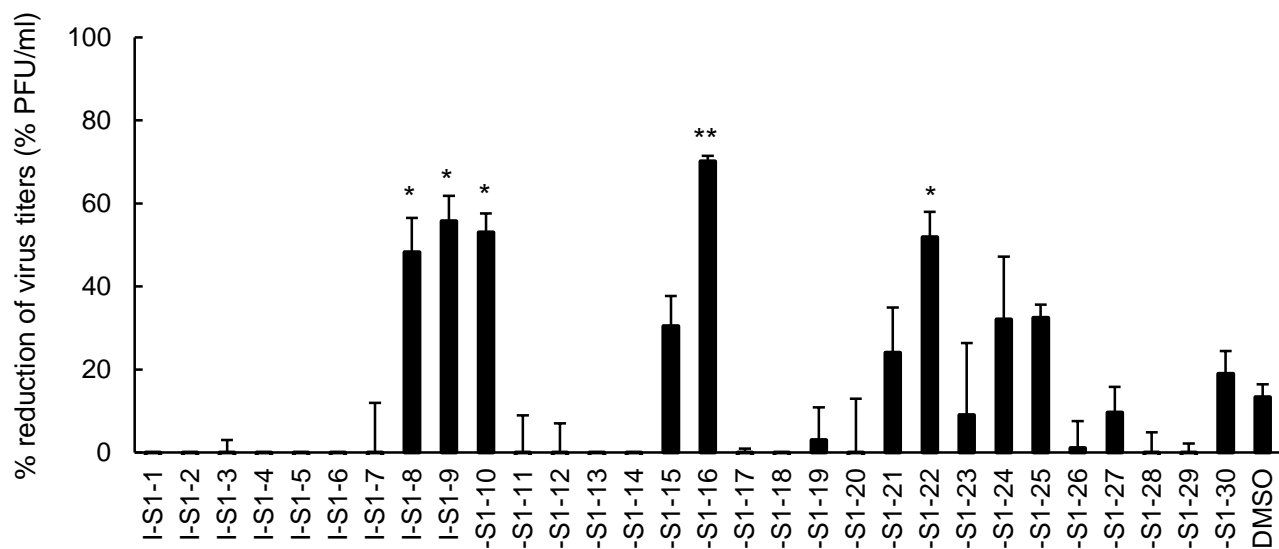
図2 FIPV感染におけるポリカチオンおよびポリアニオンの影響

階段希釈したポリカチオンまたはポリアニオンを含むメジウムでI型FIPV KU-2株を希釈した。fcwf-4細胞に希釈したウイルス液を接種した。1時間の吸着後、細胞を洗浄し2%FCSおよび1.5%カルボキシメチルセルロースを含むメジウムを重層した。

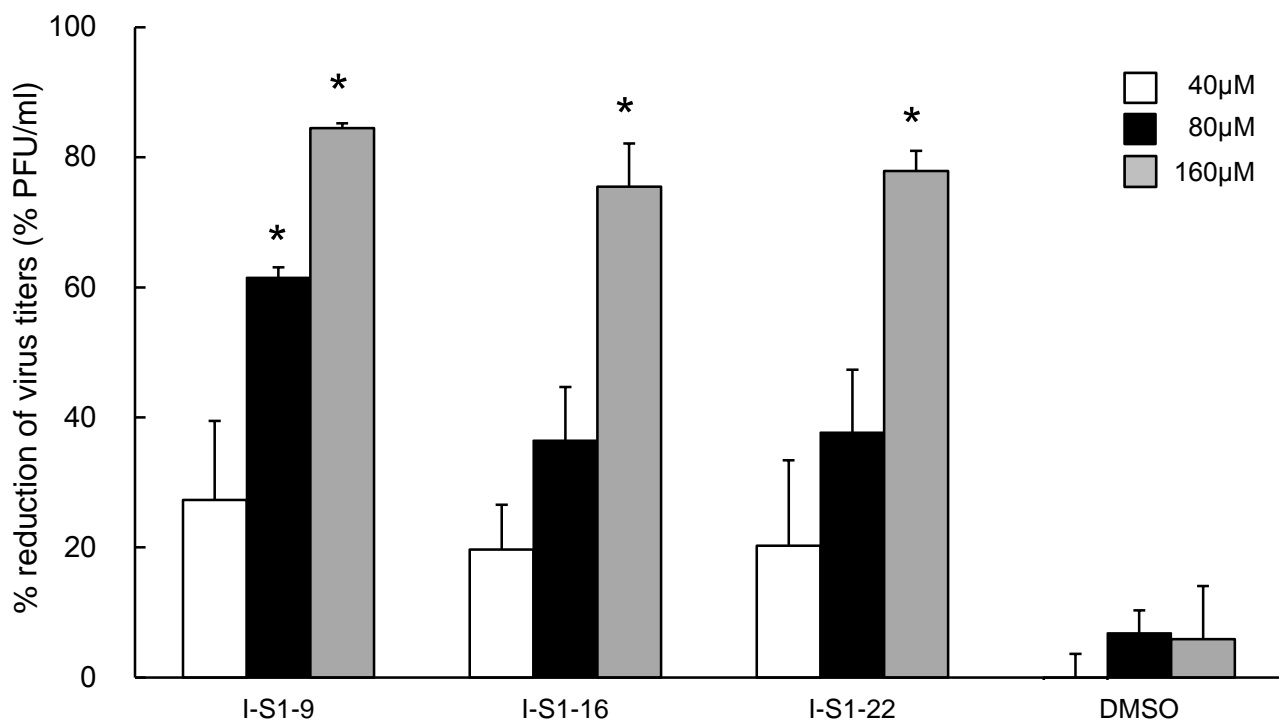
37°Cで2日間培養後、細胞をクリスタルバイオレットで染色しプラック数を計測した。プラック形成率を以下の式で計算した。

プラック形成率(%) = { (ポリカチオンまたはポリアニオンを含むメジウムでウイルスを希釈したwellのプラック数 / ポリカチオンまたはポリアニオンを含まないメジウムでウイルスを希釈したwellのプラック数) } x 100。

A



B

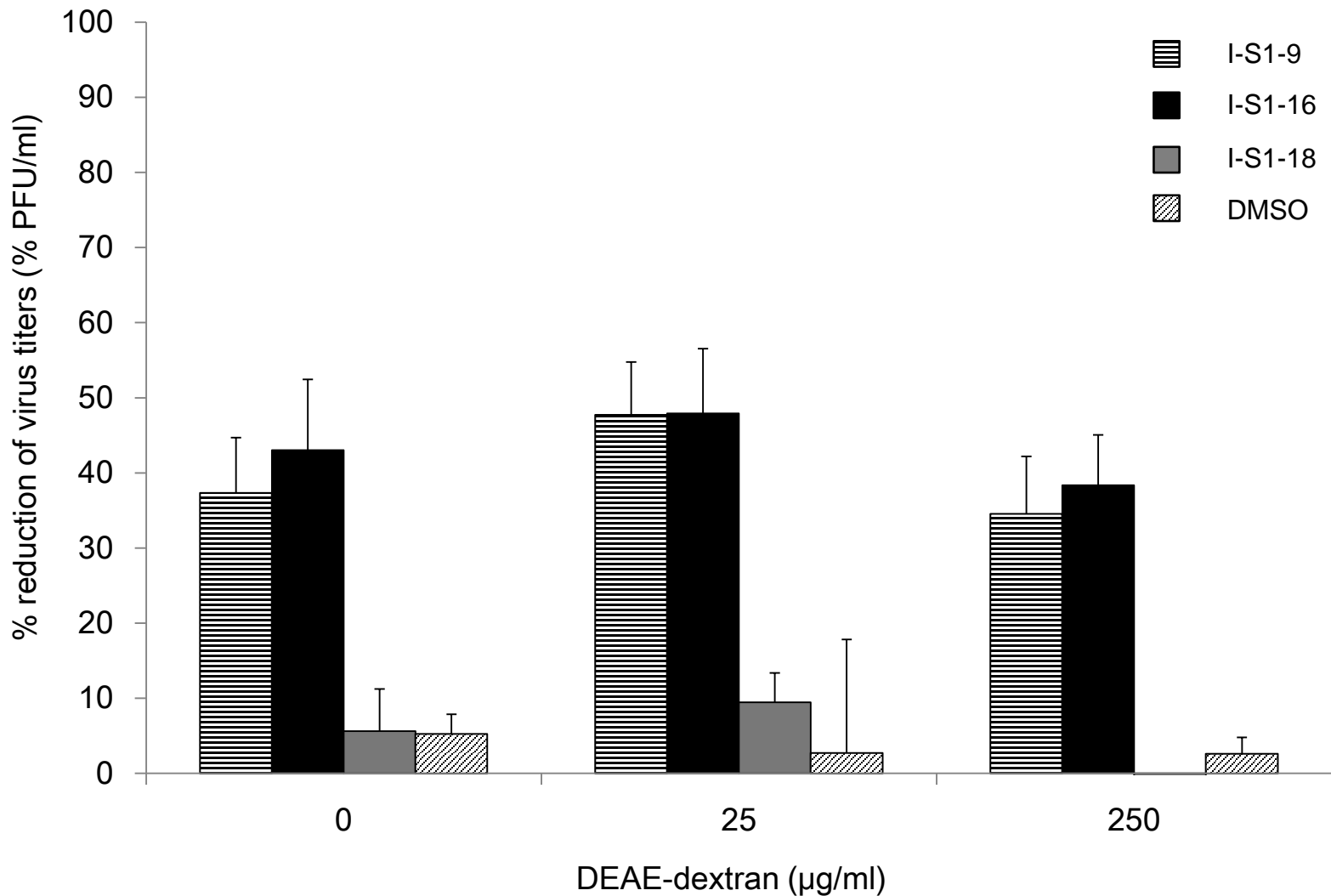


### 図3 FIPV感染を抑制するI型FIPV S蛋白質由来ペプチドの検索

(A) I型FIPV S蛋白質由来ペプチドのプラック減少率。fcwf-4細胞にペプチド (100  $\mu$ M) または1% DMSO (solvent control) を加え室温で30分間処理した。そこにI型FIPV KU-2株をペプチドまたはDMSO存在下で接種した。2日間培養後に染色し、プラック減少率を算出した。

(B) 階段希釈したペプチドのプラック減少率。fcwf-4細胞にペプチド (160、80、40  $\mu$ M) または1% DMSOを加え室温で30分間処理した。そこにI型FIPV KU-2株をペプチドまたはDMSO存在下で接種した。

\*:  $p < 0.05$  vs. DMSO \*\*:  $p < 0.01$  vs. DMSO

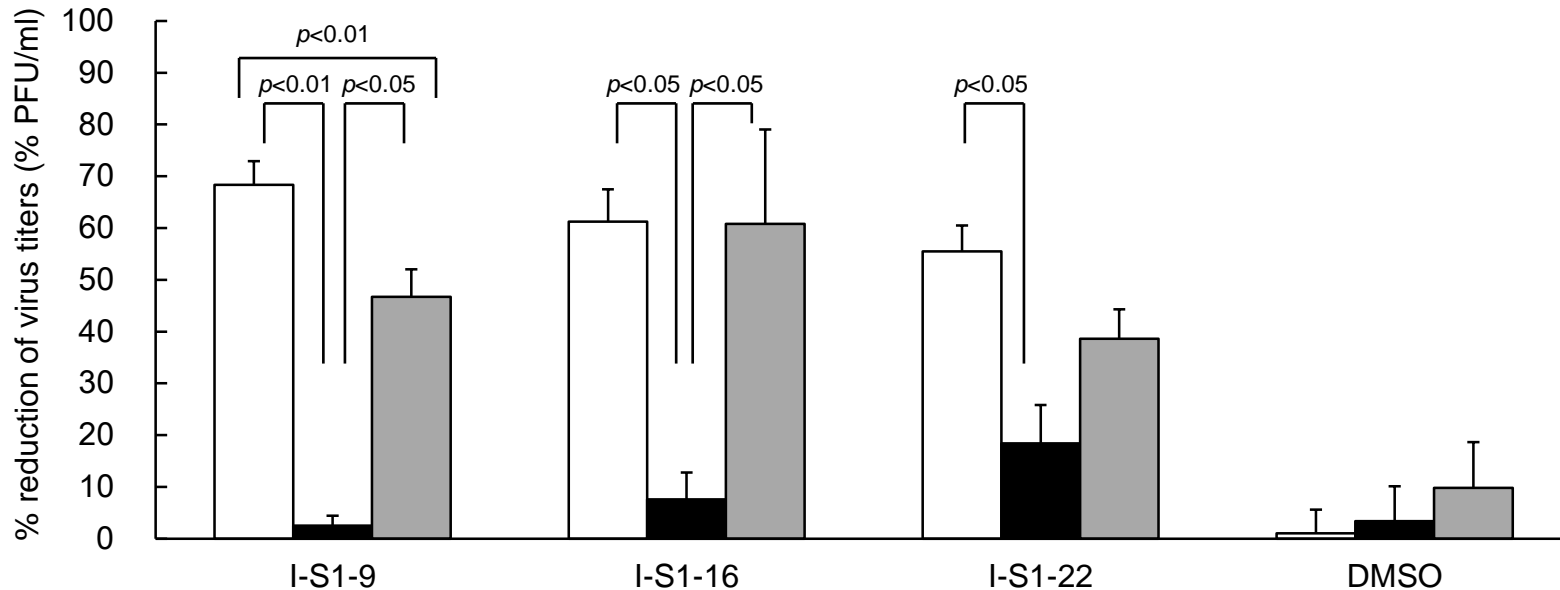


**図4 メジウムの電荷がペプチドの感染抑制効果に及ぼす影響**

ペプチドとウイルスを0、25または250 µg/mLの濃度に調整したDEAE-dextranを含むメジウムで希釈した。fcwf-4細胞をペプチド (100 µM)または1% DMSO (solvent control) で室温30分間処理した。その後、I型 FIPV KU-2株をペプチドまたは1% DMSO存在下で接種した。

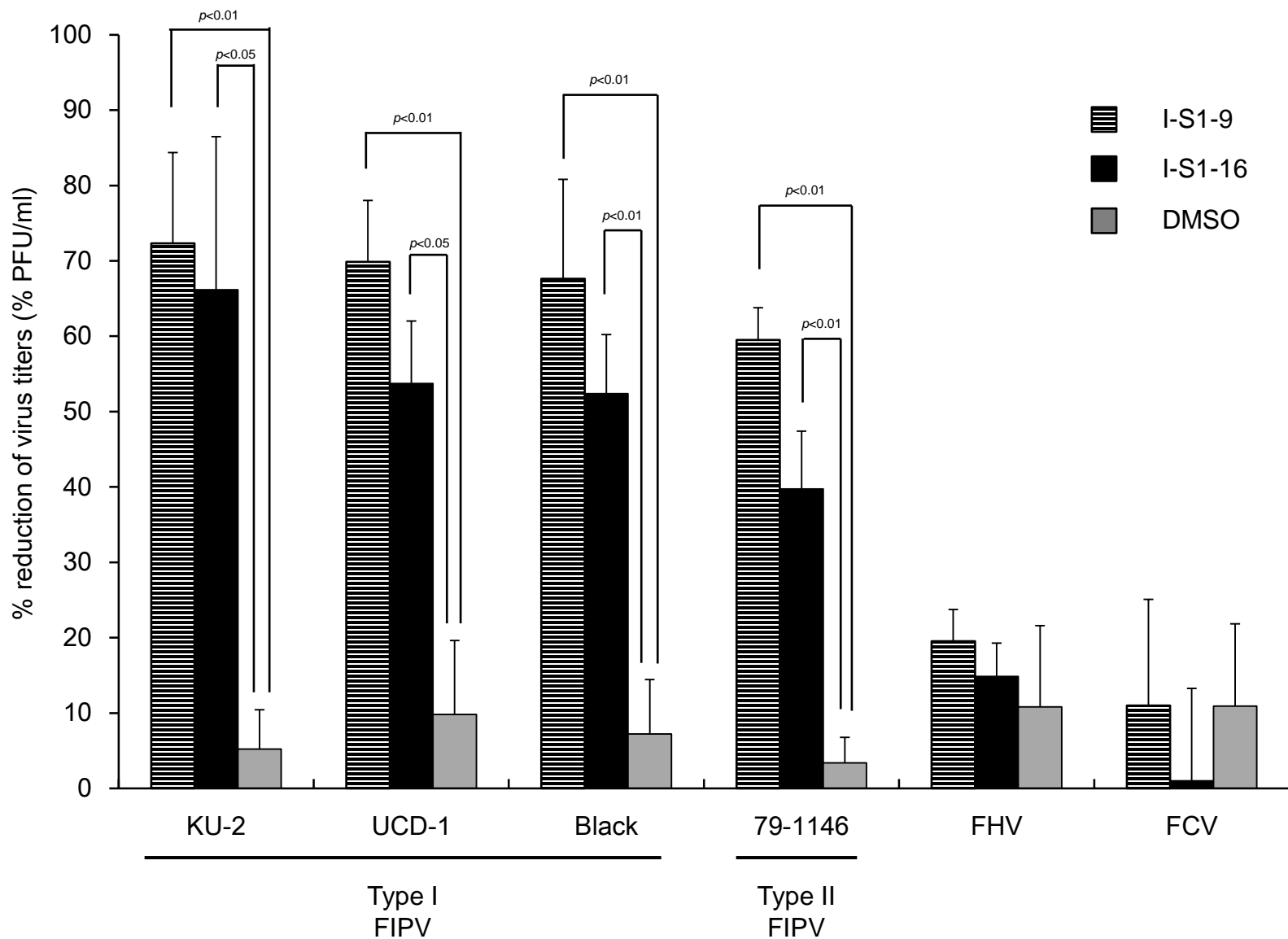


- pretreated with peptides and inoculated with the virus
- pretreated with peptides and washed before the virus inoculation
- inoculated with a mixture of peptides and the virus without the pretreatment with peptides



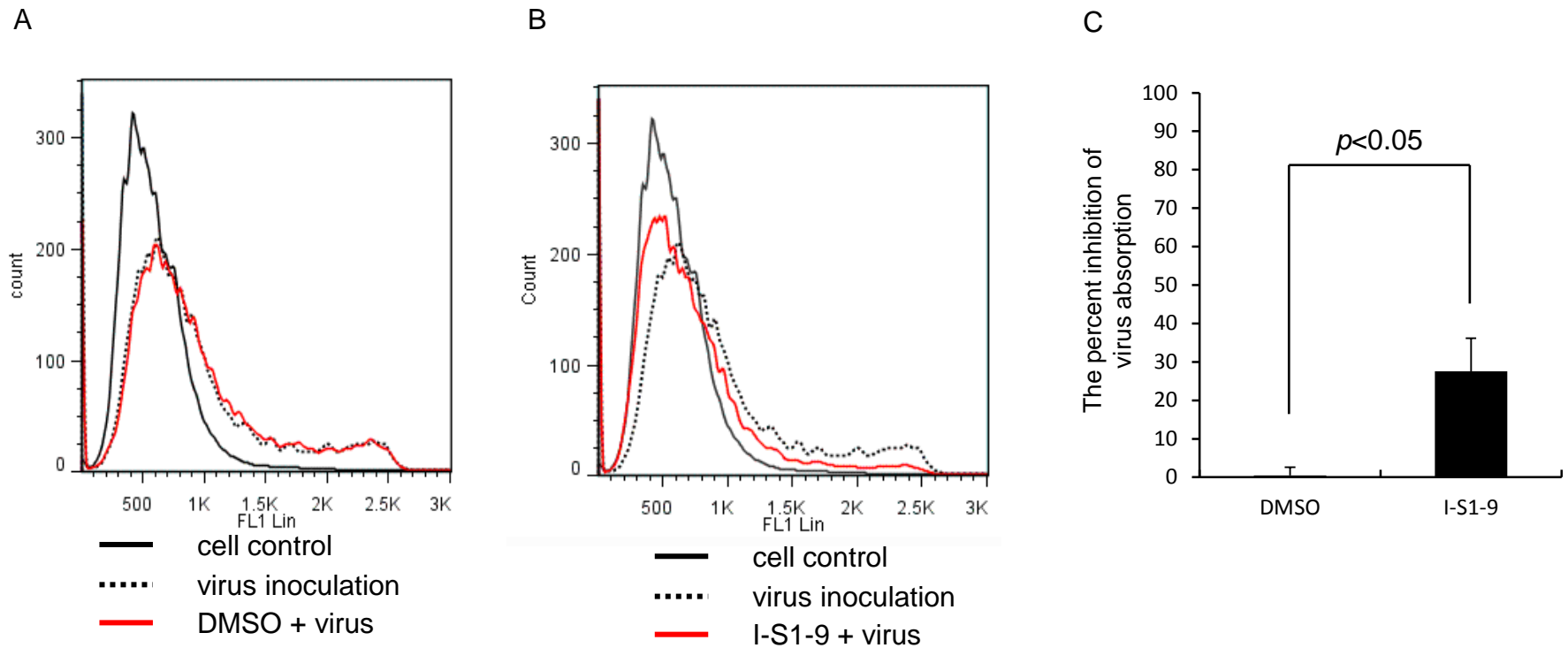
### 図5 ペプチドがFIPVの感染を抑制する条件の検討

ペプチドの感染抑制効果を示す反応条件を検討するためにペプチドを処理した細胞を洗浄してからウイルスを接種した。細胞に希釈したペプチド(100  $\mu$ M)または1%DMSOを接種し、室温で30分間反応させた。細胞を洗浄してDEAE-dextran加メジウムを90  $\mu$ l細胞に加えた。続いて、そこに8000 pfu/mlのウイルスを10  $\mu$ l接種した(■)。また、同時に、細胞への前感作をしなくてもペプチドが感染抑制効果を示すか否かも調べた。すなわちDEAE-dextran加メジウムを室温で30分間静置した後メジウムを除去し、ペプチドまたはDMSOとウイルスの混合液を同時に細胞に接種した(□)。



**図6 ペプチドのI型FIPV、II型FIPV、FHVおよびFCVに対する抗ウイルス効果**

fcwf-4細胞にペプチド (100  $\mu$  M)または1% DMSO (solvent control)を加えて室温30分間処理した。そこにI型 FCoV KU-2株、UCD-1株またはBlack株、II型 FCoV 79-1146株、FHV C7301株またはFCV F4株をそれぞれ接種した。染色後、プラック数を計測した。



**図7 ペプチドのfcwf-4細胞に対するFIPV吸着抑制効果**

ペプチド (I-S1-9, 100  $\mu$ M) と II 型 FIPV 79-1146 株 (MOI=40) を混和し、 $5 \times 10^4$  の fcwf-4 細胞に接種して 4°C で 1 時間反応させた。コントロールとして 1% DMSO とウイルスの混合液を細胞に接種した。細胞を洗浄し、mAb 5-6-2 と mAb F19-1 を加えて 4°C で 30 分間反応させた。洗浄後、FITC-conjugated F(ab)'<sub>2</sub> of goat anti-mouse IgG antibody で染色した。4°C で 30 分間のインキュベート後、細胞を洗浄して細胞の fluorescein intensity を flow cytometer を用いて測定した。

(A) および (B) DMSO またはペプチドとウイルスの混合液を接種した fcwf-4 細胞の Fluorescence intensity のヒストグラム。

(C) ウイルス吸着抑制率。ウイルス吸着抑制率を mean fluorescein intensity (MFI) を基に以下の式から算出した。ウイルス吸着抑制率 (%) = { (ウイルスのみを含むサンプルの MFI - ペプチドまたは DMSO を含むサンプルの MFI) / ウイルスのみを含むサンプルの MFI } x 100。

### 第 3 章

猫伝染性腹膜炎（FIP）に対する治療を目的とした  
抗 fTNF- $\alpha$  モノクローナル抗体の開発

## 緒論

tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) は 26-kDa の膜蛋白質 (膜型 TNF-alpha) であり、主として活性化マクロファージから産生される。膜型 TNF-alpha はメタロプロテアーゼの一種である TNF-alpha-converting enzyme (TACE) により切断され、17-kDa の可溶性 TNF-alpha として放出される。可溶性 TNF-alpha は生体内で 55-kDa のホモトリマー構造を形成する [54, 81]。ホモトリマーの TNF-alpha は細胞表面に存在する TNF レセプター (TNFR) と結合し、様々な生理活性をもたらす [75, 96]。例として TNFR-I に結合した場合、caspase を活性化させアポトーシスを誘導する。また、TNFR-II に結合した場合、NF-kB や c-Jun といった転写因子を活性化させ、細胞寿命の延長や炎症性サイトカインの産生を誘導することで炎症や免疫反応に関わる [75, 91]。

TNF-alpha は腫瘍細胞に対してネクローシスおよびアポトーシスを誘導し、リンパ球およびマクロファージを活性化させる。しかし、TNF-alpha の過剰な産生はヒト及び他の動物に対して急性の炎症や異常な免疫反応を惹起する。過剰産生された TNF-alpha が関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患といった炎症性の免疫疾患に深く関わっていることが報告されている [13, 41, 97]。さらに、ヒト免疫不全ウイルス、A 型インフルエンザウイルス、デングウイルスを原因とするウイルス感染症においても TNF-alpha 産生の増加が病態を悪化させることが報告されている [19, 52, 70, 93, 101]。

Takano らは、FIPV 感染においてマクロファージにおけるウイルス複製が fTNF-alpha の産生を増加させることを示した [87]。FIPV 感染マクロファージから産生される fTNF-alpha はリンパ球減少症を誘導し、II 型 FIPV のレセプターであるアミノペプチダーゼ N (APN) の発現量を増加させる [86, 87]。さらに、fTNF-alpha は好中球のアポトーシスを抑制することが報告されている。すなわち、FIP 発症猫において観察される好中球増多症は fTNF-alpha により誘導される好中球の生存率の上昇が深く関わっていると考えられる [85]。

過去 40 年にわたって FIP に対する治療法が研究されてきた [23]。様々な抗ウイルス薬、免疫賦活薬、そして免疫抑制剤が FIP の治療に用いられてきた。しかし、FIP に対して有意な治療効果を示した薬剤の報告はほとんどない。いくつかの薬剤が *in vitro* の系で FCoV の複製を抑制することが報告されているが、実際に猫に対して治療効果を示すか否かは調べられていない [7, 9, 36, 39, 88, 89]。

ヒト医学領域において、抗ヒト TNF-alpha 抗体が関節リウマチや炎症性腸疾患の治療に応用されており、高い治療効果が得られている [91]。このことを踏まえると、fTNF-alpha を中和する抗体を FIP 発症猫に投与することで FIP の症状を改善できると考えられる。しかし、現在、fTNF-alpha を中和する抗体は開発されていない。そこで著者は、fTNF-alpha を認識するモノクローナル抗体 (monoclonal antibodies: mAbs) を樹立し、その fTNF-alpha に対する中和活性を調べた。さらに、抗 fTNF-alpha mAb が FIP

に対する治療薬として応用できるか否かを *in vitro* の系で検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞およびウイルス

マウスミエローマ細胞である F0 細胞 (ATCC CRL-1646) および fTNF- $\alpha$  を産生するハイブリドーマ細胞は Dulbecco' s modified Eagle' s minimum essential medium にウシ胎仔血清を 10%、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。猫肺胞マクロファージ、猫好中球、マウス骨髄腫細胞である WEHI-164 細胞 (ATCC CRL1751)、および猫 T リンパ球株化細胞の Fet-J 細胞は RPMI 1640 medium にウシ胎仔血清を 10%、2-mercaptoethanol を 50  $\mu$  M、polybrene を 2  $\mu$  g/ml、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。細胞は全て 37°C の湿潤条件下で CO<sub>2</sub> 濃度を 5% に設定して培養した。F0 細胞および WEHI-164 細胞は ATCC より購入した。Fet-J 細胞はフロリダ大学の Dr J. K. Yamamoto より分与を受けた。II 型 FIPV 79-1146 株は fcwf-4 細胞を用いて 37°C の条件で培養したものを用いた。FIPV 79-1146 株はユトレヒト大学の Dr. M. C. Horzinek より分与を受けた。

### 2. 抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製

10  $\mu$  g の組換え fTNF- $\alpha$  (R&B SYSTEMS.、U. S. A.) とフロイントの完全アジュバントを混和したものを 4 週齢の BALB/c マウスの腹腔に接種した。3 週または 4 週おきに 1  $\mu$  g の組換え



fTNF-alpha を 4~5 回追加接種した。最後の追加接種から 3 日後にマウスを安楽死させ、脾細胞を回収した。脾細胞と F0 細胞の細胞融合は Köhler および Milstein[42]の方法に従って実施した。細胞融合試薬として Polyethyleneglycol-4000 (Merck、Germany) を用いてマウス脾細胞と F0 細胞を 3:1 の割合で混合し、細胞融合を行った。選択培地にはヒポキサンチンを  $10^{-4}$  M、アミノプテリンを  $4 \times 10^{-7}$  M、チミジンを  $1.6 \times 10^{-5}$  M 加えた。融合細胞は  $1 \times 10^6$  の濃度で 96 穴の平底プレートに播種し、37°C で培養した。2 週間培養後、組換え fTNF-alpha に対する抗体を産生する細胞を後述の enzyme-linked immunosorbent assay を用いてスクリーニングした。抗体陽性のコロニーが存在するウェルを 24 穴プレートに継代し、ヒポキサンチン ( $10^{-4}$  M) およびチミジン ( $1.6 \times 10^{-5}$  M) を加えた培地で培養した。抗体産生細胞に対して限界希釈法によるクローニングを行った。

### 3. Enzyme-linked immunosorbent assay

0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈した組換え fTNF-alpha (50 ng/100  $\mu$  l/well) を ELISA プレート (Sumitomo Bakelite Co. Ltd., Japan) のウェルに加え、4°C で一晚固相化した。0.02 % Tween-20 加リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、プレートに 0.5 % スキムミルク加 PBS を加え、37°C で 60 分間ブロッキング反応を行った。ブロッキング後、ハイブリドーマの培養上清を各ウェルに 100  $\mu$  l 加え、37°C で 60 分間インキュベートした。プレートを洗浄し、peroxidase (POD) 標識抗マウス IgG1 ヤギ抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc., U.S.A.) と POD 標識抗マウス

IgG2a ヤギ抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc., U.S.A.) を混和したものを各ウェルに  $100\ \mu\text{l}$  加えた。37°C で 30 分間インキュベートした後、プレートを洗浄し、基質液を各ウェルに  $100\ \mu\text{l}$  加え、室温暗所で 20 分間呈色反応を行った。基質液は 0.1M クエン酸 - リン酸緩衝液 (pH 4.8) に o-phenylenediamine dihydrochloride を 0.4 mg/ml、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を  $0.2\ \mu\text{l}/\text{ml}$  加えたものを用いた。呈色反応後、反応を 3 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  で停止させ波長 492 nm における吸光度を測定した。

#### 4. mAb のクラスおよびサブクラスの決定

ハイブリドーマの培養上清および mouse MAb isotyping test kit (Serotec Ltd., U.K.) を用いて mAb のクラスおよびサブクラスを決定した。方法はキットに添付された説明書に従った。

#### 5. mAb の精製

ハイブリドーマの培養上清中に含まれる mAb を Protein G Sepharose (GE Healthcare., U.S.A.) を用いて精製した。精製は Protein G Sepharose に添付された説明書に従って行った。精製後、Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices (NMWL 30,000; Millipore, U.S.A.) を用いて mAb の緩衝液を PBS (pH 7.4) に置換した。その後、mAb の蛋白質濃度を Bradford 法により測定した。

#### 6. Western immunoblotting assay

組換え fTNF-alpha または天然型 fTNF-alpha を含む FIPV 感染マクロファージの培養上清を 15% ポリアクリルアミドゲルを用い

て電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。分子量マーカー (Precision Plus protein All Blue Standards) は Bio-Rad 社より購入した。転写後、転写膜を 5% スキムミルク加 TBST (20 mM Tris-HCl、pH 8.0、0.88 % NaCl、0.05 % Tween-20) に浸漬し 37°C で 60 分間ブロッキング反応を行った。その後、抗 fTNF-alpha mAb と 37°C、60 分間反応させた。洗浄後、horseradish peroxidase 標識抗 mouse IgG1 ヤギ抗体と 37°C、60 分間反応させた。その後、転写膜を基質液に 10 分間浸漬し、呈色反応を行った。

#### 7. マウス線維肉腫細胞 (WEHI-164 細胞) を用いた精製抗

fTNF-alpha mAb の fTNF-alpha に対する中和活性の測定

WEHI-164 細胞を 1  $\mu$ g/ml の Actinomycin D (Sigma Lab., U.S.A.) を添加した希釈用培地で浮遊し、37°C で 3 時間事前にインキュベートした。階段希釈した mAb を 40 ng/ml の組換え fTNF-alpha または FIPV 感染マクロファージ培養上清 (天然型 fTNF-alpha) と混和した。混和後、混合物を 37°C で 1 時間インキュベートした。3 時間インキュベートした細胞を 96 穴プレートに 50  $\mu$ l ずつ播種し、そこに反応後の混合物を 50  $\mu$ l ずつ加え、37°C で 24 時間培養した。培養後、10  $\mu$ l の WST-8 溶液 (WST-8 cell proliferation assay kit; Kishida Chemical Co., Ltd., Japan) を各ウェルに加え、37°C で 1 時間呈色反応を行った。反応後、波長 450nm における吸光度を測定した。中和率は以下の計算式に従って算出した: Neutralization (%) = (mAb とサンプルを含むウェルの O.D. 値 - サンプルのみを含むウェルの O.D. 値) / mAb とサンプルを含まないウェルの O.D. 値 x 100.

## 8. 供試動物

II 型 FIPV 79-1146 株 ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) を 6-8 ヲ月齡の SPF 猫に経口・経鼻接種した。9 頭の猫が FIP を発症し、発熱、体重減少、腹腔および胸腔への滲出液の貯留、沈鬱、呼吸困難を示した。FIP の診断は剖検時に、滲出液および各種臓器の化膿性肉芽腫を確認して行った。安楽死を行う際に静脈血および肺泡マクロファージを採取して実験に供した。全ての動物実験は北里大学の動物実験ガイドラインに従って行った。

## 9. 好中球の分離

好中球の分離は Takano らの方法に従った [85]。ヘパリン加血液を PBS で 2 倍に希釈し、Ficoll-Hypaque 溶液を用いて 800 xg で 20 分間密度勾配遠心を行った。末梢血単核球の層を除去し、赤血球と好中球を含むペレットを等量の 6% デキストラン加 0.9% NaCl で浮遊した。浮遊液を 37℃ で 45 分間静置し、赤血球を沈殿させた。上部の透明層を回収し、400 xg で 10 分間遠心した。ペレットを 2ml の 0.9% NaCl 液で浮遊し、6ml の滅菌水を加え室温で 2 分間静置した。さらに 2ml の 3.5% NaCl 液を加え、400 xg で 10 分間遠心した。上清除去後 PBS で 2 回洗浄し、培養液に浮遊したものを好中球として実験に供した。また、この浮遊液を用いて塗抹標本を作製し、それを Wright-Giemsa 染色して、好中球が 98% 以上含まれていることを確認した。

10. 組換え fTNF-alpha と共培養した FIP 発症猫好中球の生存率  
に対する抗 fTNF-alpha mAb の影響

猫好中球 ( $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$  l) を組換え fTNF-alpha (終濃度 100 ng/ml または 10 ng/ml) および抗 fTNF-alpha mAb (終濃度 10  $\mu$  g/ml) の存在下で 24 時間培養した。培養後 10  $\mu$  l の WST-8 溶液を各ウェルに加え、さらに 4 時間培養した。吸光度を前述と同様に測定した。生存率 (%) は以下の式に従って算出した：生存率 (%) = (24 時間培養後における O.D. 値 / 培養開始時における O.D. 値)  $\times$  100.

11. RNA の抽出および cDNA 合成

マクロファージからの全 RNA の抽出は High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Switzerland) を用いて行った。抽出手順はキットに添付された説明書に従った。抽出した全 RNA に Ready-to-Go RT-PCR beads (GE Healthcare Life Sciences, USA) を溶解させ、さらに 0.5  $\mu$  g の oligo(dT)12-18 primer を加えた。その後、42°C で 1 時間の逆転写反応を行い cDNA を合成した。

12. PCR による猫 GAPDH および fAPN mRNA の定量

GAPDH、fAPN mRNA 遺伝子の増幅に使用したプライマーの塩基配列については表 2 に示した。

PCR は反応液の全量を 50  $\mu$  l にして行った。滅菌精製水 37  $\mu$  l に 10xEx Taq buffer (TaKaRa, Japan) 5  $\mu$  l、2.5mM/each dNTP mixture 4  $\mu$  l、20  $\mu$  M primer (sense primer、antisense primer) を各 1  $\mu$  l、ex Taq polymerase (TaKaRa, Japan) 1  $\mu$  l、さらに

RT産物を $1\mu\text{l}$ 加えて混合した。DNAの増幅反応はPCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa, Japan)で、 $94^{\circ}\text{C}$ 5分間の熱変性に続いて、 $94^{\circ}\text{C}$ 30秒間(熱変性)、 $55^{\circ}\text{C}$ 45秒間(アニーリング)、 $72^{\circ}\text{C}$ 45秒間(伸長反応)のサイクルを35サイクル行い、最後に $72^{\circ}\text{C}$ 5分間の伸長反応を行った。PCR産物は、DNA分子量マーカールとともに2%アガロースゲルで100V、定電圧、20分間の電気泳動を行った。その後、SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Roche Diagnostics, Switzerland)溶液で45分間染色し、UVトランスイルミネーター(312nm)にてバンドの確認を行った。電気泳動で得られたバンドパターンのデータをコンピュータに取り込み、Scion Imaging Software (Scion Corporation, U.S.A.)を用いてデンストグラムによる各バンドの量の算出を行い、これをmRNA量とした。fAPNのmRNA量は、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNA量に対する相対的発現量(relative density value)として定量的に解析した。

### 13. 猫肺胞マクロファージの分離

肺胞マクロファージはHohdatsuらの方法に従ってSPFおよびFIPV感染猫の肺胞洗浄液から回収した[27]。即ち、肺胞洗浄液を遠心して得た細胞沈査をHank's balanced salt solutionで3回洗浄後、培養液に浮遊して $2 \times 10^6$  cells/mlに調整した。この細胞浮遊液を24穴プレートに1mlずつ分注し、 $37^{\circ}\text{C}$ で2時間培養した。その後、上清を捨て、3回洗浄後、未接着細胞を取り除いたものを肺胞マクロファージとして使用した。

14. 組換え fTNF-alpha と共培養した猫肺胞マクロファージにおける fAPN mRNA の発現に対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果

SPF 猫から分離した猫肺胞マクロファージ ( $2 \times 10^6$  cells) を組換え fTNF-alpha (10 ng/ml) および抗 fTNF-alpha mAb の存在下で 3 日間培養した。培養後細胞を回収し、fAPN mRNA 発現量の測定に供した。

15. TNF-alpha が猫 T リンパ球株化細胞に誘導するアポトーシスに対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果

組換え fTNF-alpha (20 ng/ml) とハイブリドーマの培養上清 (最終希釈倍率 : 8 倍) を混和し、37°C でインキュベートした。Fet-J 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells) に組換え fTNF-alpha とハイブリドーマの培養上清の混合物を接種し、4 時間培養した。培養後、組換え fTNF-alpha のアポトーシスの誘導活性を測定した。アポトーシス誘導の有無は TUNEL 法を用いて検出した。方法は Takano らの手順に従った [86]。

16. Statistical analysis

2 群間からなるデータは Student's t test を用いて解析し、多群からなるデータは one-way ANOVA 法を用いて解析した。

## 実験成績

### 1. 抗 fTNF-alpha mAb の作製と mAb の fTNF-alpha に対する反応性

組換え fTNF-alpha 免疫マウスの脾細胞と F0 細胞の細胞融合は 3 回実施した。ELISA によるスクリーニングの結果、9 種類のハイブリドーマを樹立した。mAb のアイソタイプおよび特異性を表 3 および図 8 に示した。

全ての mAb の組換え fTNF-alpha に対する反応性を Western blotting を用いて解析したところ、5 種類の mAb が分子量 17-kDa の位置に特異的なバンドを生じた (図 8)。また、天然型 fTNF-alpha を含む FIPV 感染マクロファージの培養上清に対する mAb の反応性を確かめた。その結果、7 種類の mAb が分子量 51-kDa の位置に特異的なバンドを生じた (図 8)。

### 2. fTNF-alpha に対する抗 fTNF-alpha mAb の中和活性

全ての mAb の組換え fTNF-alpha に対する中和活性を WEHI-164 細胞を用いた細胞障害試験で調べた。mAb の中和活性を比較する指標として組換え fTNF-alpha の細胞障害活性を 50% 抑制する濃度を IC50 として用いた。全ての mAb が組換え fTNF-alpha の活性を濃度依存的に中和した。9 種類のうち 3 種類の mAb (mAb 1-1、mab 2-3 および mab 2-4) は特に高い中和活性を有していた。(表 3、図 9)。

mAb の天然型 fTNF-alpha に対する中和活性を同様の手順で測定した。天然型 fTNF-alpha として FIPV 感染マクロファージの培養



上清を用いた。組換え fTNF-alpha に対する中和活性を基に 3 種類の mAb を選抜した。その結果、mAb 2-4 は組換えおよび天然型のどちらに対しても特に強い中和活性を有していた (表 3、図 10)。

### 3. fTNF-alpha と共培養した FIP 発症猫好中球の生存率に対する抗 fTNF-alpha mAb の影響

TNF-alpha が FIP 発症猫の好中球の生存率を上昇させることが報告されている [85]。好中球の増加は FIP の病態を悪化させる可能性が示唆されている。これらの報告を踏まえ、組換え fTNF-alpha による好中球の生存率の上昇を mAb 2-4 を用いて抑制できるか否かを調べた。100 ng/ml の組換え fTNF-alpha の存在下で培養した好中球の生存率は培地のみで培養した好中球の生存率と比べて有意に高かった (図 11)。一方、100 ng/ml の組換え fTNF-alpha および mAb 2-4 の存在下で培養した好中球の生存率は組換え fTNF-alpha のみの存在下で培養した好中球の生存率より有意に低かった。

### 4. fTNF-alpha と共培養した猫肺胞マクロファージにおける fAPN mRNA の発現に対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果

TNF-alpha はマクロファージにおける fAPN の発現量を増加させる。fAPN が増加したマクロファージは FIPV の感染性が高まり、ウイルス産生量も増加することが報告されている [87]。組換え fTNF-alpha による fAPN mRNA 発現量の増加を mAb 2-4 が抑制できるか否かを調べた。組換え fTNF-alpha の存在下で培養した肺胞マクロファージの fAPN mRNA 発現量は培地のみで培養したものと

比較して有意に増加した(図 12)。一方、組換え fTNF-alpha および mAb 2-4 の存在下で培養した肺胞マクロファージの fAPN mRNA 発現量は組換え fTNF-alpha のみの存在下で培養したものと比較して有意に低かった。

#### 5. TNF-alpha が T リンパ球株化細胞に誘導するアポトーシスに対する抗 fTNF-alpha mAb の抑制効果

FIP 発症猫ではリンパ球、特に T 細胞の減少に伴う細胞性免疫の低下が認められる。リンパ球の減少の要因として、TNF-alpha によるリンパ球のアポトーシス誘導が示唆されている [86]。mAb 2-4 が組換え fTNF-alpha のリンパ球に対するアポトーシス誘導を抑制できるか否かを猫 T リンパ球株化細胞である Fet-J 細胞を用いて調べた。Flow cytometry により測定した Fet-J 細胞の蛍光強度のヒストグラムを図 13A に示した。組換え fTNF-alpha を反応させた Fet-J 細胞のヒストグラムは二峰性のピークを示し、アポトーシスが誘導されていた。組換え fTNF-alpha の存在下で培養した Fet-J 細胞におけるアポトーシス陽性細胞の割合は培地のみで培養したものと比較して有意に増加した。一方、組換え fTNF-alpha および mAb 2-4 の存在下で培養した Fet-J 細胞におけるアポトーシス陽性細胞の割合は組換え fTNF-alpha のみの存在下で培養したものと比較して有意に低かった(図 13B)。

## 考察

これまでに fTNF-alpha を中和する mAb は作出されていない。今回、著者は組換え fTNF-alpha を免疫することによって fTNF-alpha を中和する 9 種類の mAb を作出した。Western blotting において、これら 9 種類の mAb は組換えおよび FIPV 感染マクロファージ培養上清に含まれる天然型 fTNF-alpha に対して異なる反応性を示した。Western blotting に用いた fTNF-alpha は 2-メルカプトエタノールを用いて変性させた。組換えおよび天然型 fTNF-alpha のいずれにも特異的バンドを形成しなかった mAb (mAb 1-2 および mAb 2-2) は fTNF-alpha の立体的な構造を認識していると考えられた。一方、天然型 fTNF-alpha に対してのみ特異的バンドを形成した mAb (mAb 2-1 および mAb 3) の抗原認識性の詳細は明らかにできなかった。組換え fTNF-alpha は monomer を形成し、その分子量は 17 kDa である。一方、天然型 fTNF-alpha は homo trimer を形成し、その分子量は約 50 kDa である。即ち、組換え fTNF-alpha は monomeric の TNF-alpha であり、天然型 fTNF-alpha は trimetric の TNF-alpha と考えられる [77]。このことから、mAb 2-1 および mAb 3 は trimetric の fTNF-alpha のみを認識する可能性が考えられる。Saijo らは trimeric human TNF-alpha を認識する mAb 3F2 の作出を報告した [78]。彼らは、trimeric human TNF-alpha を NP40 で処理して monomeric human TNF-alpha に変性させた場合、mAb 3F2 の反応性が低下することを報告している。mAb 2-1 および mAb 3 は monomeric の TNF-alpha

を固相化した ELISA において他の mAb と同様に反応した。Smith らは、変性剤のない溶液中においては、monomeric の TNF-alpha は自ら結合して、その多くが trimeric の TNF-alpha となることを報告している [81]。従って、組換え fTNF-alpha も変性剤のない溶液では trimer を形成し ELISA においても反応した可能性が考えられる。即ち、mAb 2-1 および mAb 3 も trimeric human mAb 3F2 と同様の性質を保有する抗体であることが考えられた。

今回作出した全ての mAb が組換え fTNF-alpha に対する中和活性を保有していたが、その中和活性の強さには mAb 間で差が認められた。mAb 2-3 および mAb 2-4 は組換え fTNF-alpha に対して最も高い中和活性を保有していた。その中和活性は mAb 1-2 および mAb 1-4 と比較して約 80 倍～100 倍高かった。mAb 2-3 と mAb 2-4 の組換え fTNF-alpha に対する IC50 はそれぞれ  $5 \pm 1$  ng/ml と  $8 \pm 2$  ng/ml であった。抗 human TNF-alpha 抗体であり実際に治療薬として応用されている adalimumAb の IC50 は 24.4 ng/ml であると報告されている [83]。即ち、mAb 2-3 と mAb 2-4 は adalimumAb と比較しても同等以上の中和活性を保有している可能性が示唆された。

天然型 fTNF-alpha に対する中和活性の測定には各 mAb の組換え fTNF-alpha に対する中和活性を参考にして 3 種類の mAb を選抜した。即ち、組換え fTNF-alpha に対する高い中和活性を有する mAb 2-4、中程度の組換え fTNF-alpha に対する中和活性を有する mAb 1-3、そして中和活性が mAb 2-4 と mAb 1-3 の中間に位置する mAb 3 を選抜した。各 mAb の持つ組換え fTNF-alpha に対する中和活性と天然型 fTNF-alpha に対する中和活性を比較するた

め、組換え fTNF-alpha (10ng/ml)の WEHI-164 細胞に対する細胞障害活性と同程度の比活性を有する濃度の天然型 fTNF-alpha を用いた。その結果、mAb 1-3 および mAb 3 の天然型 fTNF-alpha に対する中和活性は組換え fTNF-alpha に対する中和活性のおよそ 1/5~1/10 に低下した。しかし mAb 2-4 の中和活性の低下はおよそ 1/2 であった。即ち、mAb 2-4 は 3 種類の mAb のうち最も天然型 fTNF-alpha に対する中和活性が高いことが明らかとなった。従って、mAb 2-4 は他の mAb よりもより少ない投与量で FIP 発症猫の体内の fTNF-alpha を効果的に中和する可能性が示唆された。

FIP 発症猫では好中球増多症や、マクロファージにおけるウイルスレセプターである APN の増加、そしてリンパ球減少症が、FIPV 感染マクロファージより産生される fTNF-alpha により惹起される [85-87]。これら FIP の病態に対する mAb 2-4 の効果を *in vitro* で解析した。我々は、mAb 2-4 によって fTNF-alpha の活性を中和すると、i) FIP 発症猫由来好中球の生存率の上昇を抑制すること、ii) マクロファージにおける APN の mRNA の発現を抑制すること、iii) 猫 T リンパ球株化細胞に対するアポトーシス誘導を抑制すること、を確認した。即ち、mAb 2-4 は fTNF-alpha の生理活性を中和することで FIP の病態に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。これまで、FIP の治療を目的とした薬物はいくつか報告されているが、大部分は抗ウイルス作用を目的としたものである [7, 9, 23, 36, 39]。しかしながら、FIP は免疫性の炎症性疾患を引き起こすウイルス感染症である。著者が作製した mAb 2-4 と既に報告されている anti-FIPV agent(s) を併用すれば、炎症反応の抑制と共にウイルスの排除も期待できる。現在、FIP の炎症

作用を抑制するために、主に steroids が使用されている。しかし、steroids は FIPV の排除に有効な免疫機構も抑制する。mAb 2-4 は FIP の病態悪化因子である fTNF-alpha を特異的に抑えるため、steroid より治療薬としてより適していると考えられる。

今回、我々が作製した mAb 2-4 はマウス由来の蛋白質である。従って、猫に対して異種の蛋白質である mouse antibody を大量に投与した場合、アナフィラキシー反応を誘導する可能性が示唆される。Umehashi らは、定常領域を猫化した mAb (マウス-猫キメラ抗体) を猫に投与した場合、アナフィラキシー反応を誘導しないことを報告した [94]。今後は mAb 2-4 の副作用を軽減するため、遺伝子組換え技術によってマウス-猫キメラ抗体に改変する必要がある。

## 小括

FIPは猫科動物における致死性伝染性疾患である。これまでの報告から、FIPの病態悪化に炎症性サイトカインの一つであるfTNF-alphaが関わっていることが示唆されている。したがってfTNF-alphaを中和する抗体をFIP発症猫に投与することでFIPの進行を抑制できる可能性が考えられた。しかし、現在fTNF-alphaを中和する抗体は開発されていない。そこで著者はfTNF-alphaを認識するモノクローナル抗体(mAb)を作製した。全てのmAbの組換えfTNF-alphaに対する中和活性を測定した。組換えfTNF-alphaの活性を50%抑制するmAbの濃度は5~684ng/mlであった。次に、天然型fTNF-alphaに対するmAbの中和活性を測定した。測定には各mAbの組換えfTNF-alphaに対する中和活性を参考にして3種類のmAbを選抜した。即ち、組換えfTNF-alphaに対する高い中和活性を有するmAb 2-4、組換えfTNF-alphaに対する中程度の中和活性を有するmAb 1-3、そして中和活性がmAb 2-4とmAb 1-3の中間に位置するmAb 3を選抜した。これら3種類のmAbのうちmAb 2-4は組換えおよび天然型fTNF-alphaのどちらに対しても特に高い中和活性を有していた。このmAb 2-4がfTNF-alphaによって誘導されるFIPの病態悪化を抑制できるか否かをin vitroで検討した。mAb 2-4はfTNF-alphaにより誘導される、(i) FIP発症猫由来好中球の生存率増加 (ii) マクロファージにおけるアミノペプチダーゼN mRNA発現量増加 (iii) 猫Tリンパ球株化細胞のアポトーシス、を抑制した。この事実を踏ま

えると抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 は FIP の治療に有効である可能性が示唆された。



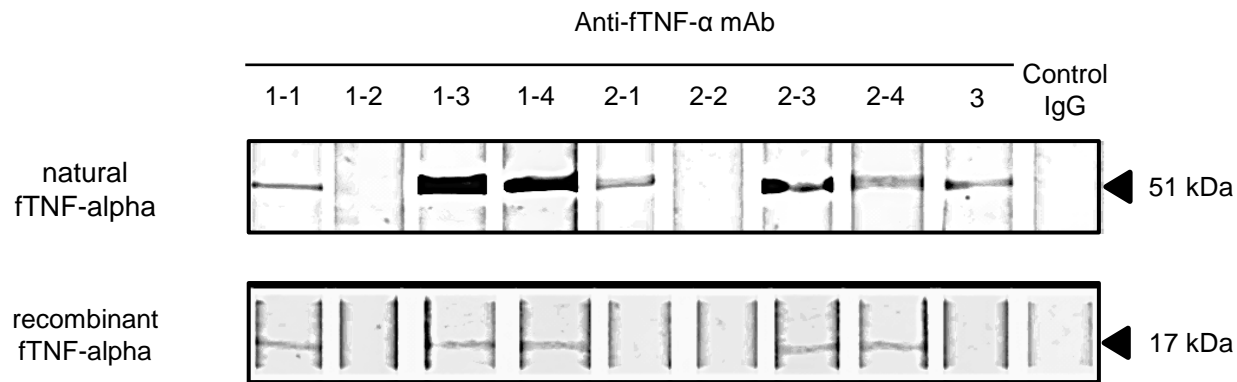
表2 PCR法で用いたプライマーの塩基配列

	Orientation	Nucleotide sequence	Location	Length (bp)
GAPDH	forward	5'-AATTCCACGGCACAGTCAAGG-3'	158-178	97
	reverse	5'-CATTTGATGTTGGCGGGATC-3'	235-254	
APN	forward	5'-AGGCTACAGATGCTCGGAAA-3'	635-614	248
	reverse	5'-ACTGGGAGCTCTTGTCTCCA-3'	882-863	

表3 抗fTNF-alpha mAbのfTNF-alphaに対する反応性と中和活性

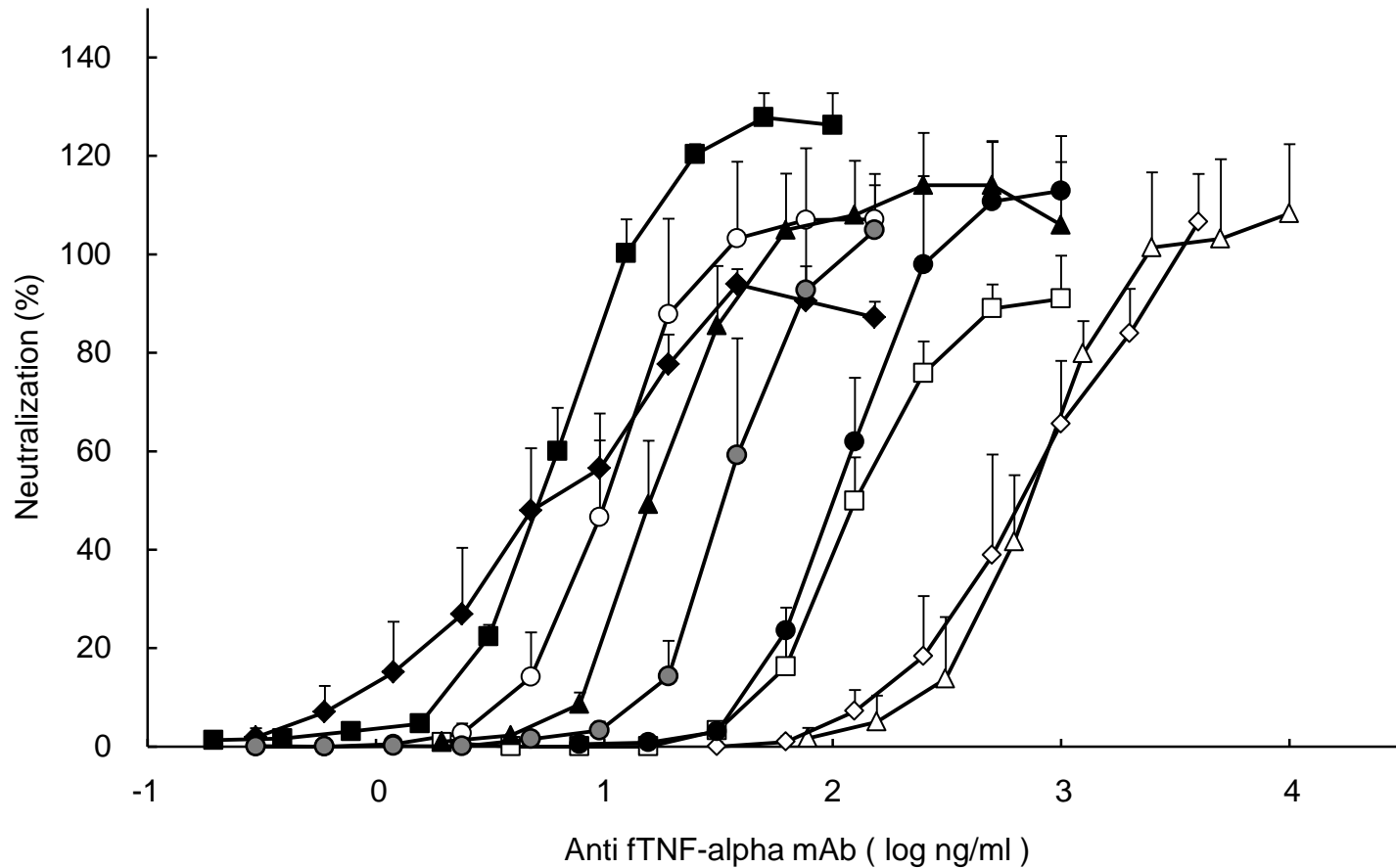
mAb	Subclass	ELISA O.D. value against rfTNF- $\alpha$	Western blot analysis of mAb reactivity with fTNF- $\alpha$		50% inhibitive concentration of mAb against WEHI-164 cytolysis induced by fTNF- $\alpha$ (ng/ml)	
			rfTNF- $\alpha$	nfTNF- $\alpha$ in FIPV-infected macrophage culture supernatant	rfTNF- $\alpha$	nfTNF- $\alpha$ in FIPV-infected macrophage culture supernatant
1-1	IgG1 / $\kappa$	1.389	17kDa	50kDa	* 11 $\pm$ 5	N.D.
1-3	IgG1 / $\kappa$	1.470	17kDa	50kDa	142 $\pm$ 25	664 $\pm$ 450
1-4	IgG1 / $\kappa$	1.425	17kDa	50kDa	682 $\pm$ 206	N.D.
2-3	IgG1 / $\kappa$	2.748	17kDa	50kDa	5 $\pm$ 1	N.D.
2-4	IgG1 / $\kappa$	2.875	17kDa	50kDa	8 $\pm$ 2	13 $\pm$ 8
2-1	IgG1 / $\kappa$	2.613	—	50kDa	107 $\pm$ 21	N.D.
3	IgG1 / $\kappa$	2.592	—	50kDa	38 $\pm$ 14	315 $\pm$ 98.
1-2	IgG1 / $\kappa$	1.498	—	—	664 $\pm$ 160	N.D.
2-2	IgG1 / $\kappa$	2.679	—	—	22 $\pm$ 6	N.D.

\*: mean $\pm$ S.E.



**図8 抗fTNF-alpha mAbのfTNF-alphaに対する反応性**

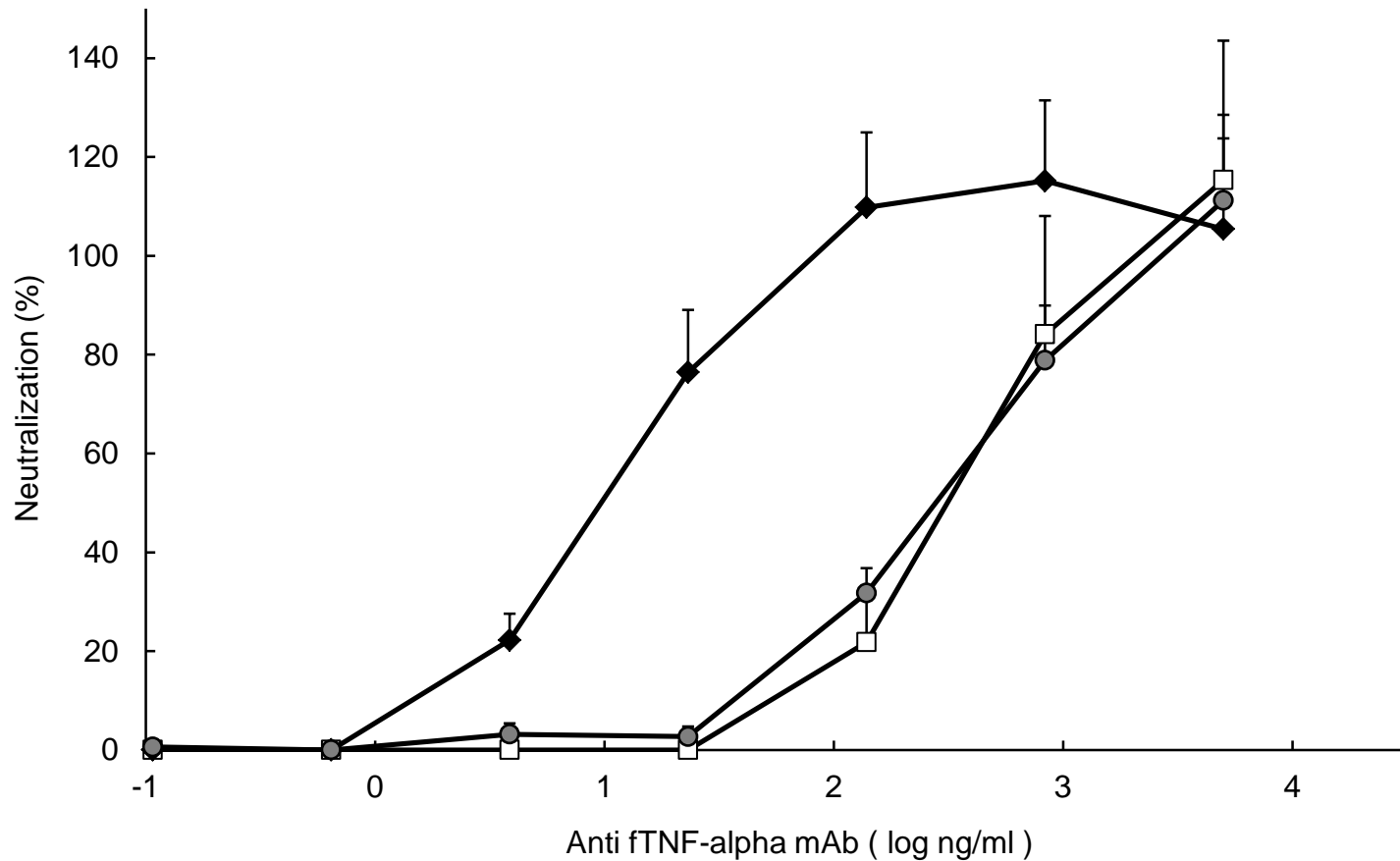
組換えまたは天然型fTNF-alphaを含むFIPV感染マクロファージ培養上清を15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキング後、抗fTNF-alpha mAbをそれぞれ37°Cで1時間反応させた。コントロールとして抗グルタチオンSトランスフェラーゼmAbを反応させた。洗浄後、horseradish peroxidase標識抗mouse IgG1ヤギ血清を37°Cで1時間反応させた。



**図9 組換えfTNF-alphaに対する抗fTNF-alpha mAbの中和活性**

階段希釈した精製抗fTNF-alpha mAbと組み換えfTNF-alpha(最終濃度10ng/ml)を等量混合し37°Cで60分間反応させた。反応させた検体とWEHI-164細胞( $1 \times 10^6$  cells/ml)を各50  $\mu$ l/wellずつ96穴プレートに加え混和し、37°Cで24時間培養した。培養後、WST-8を10  $\mu$ l/well加え、37°C、60分間呈色反応を行った。

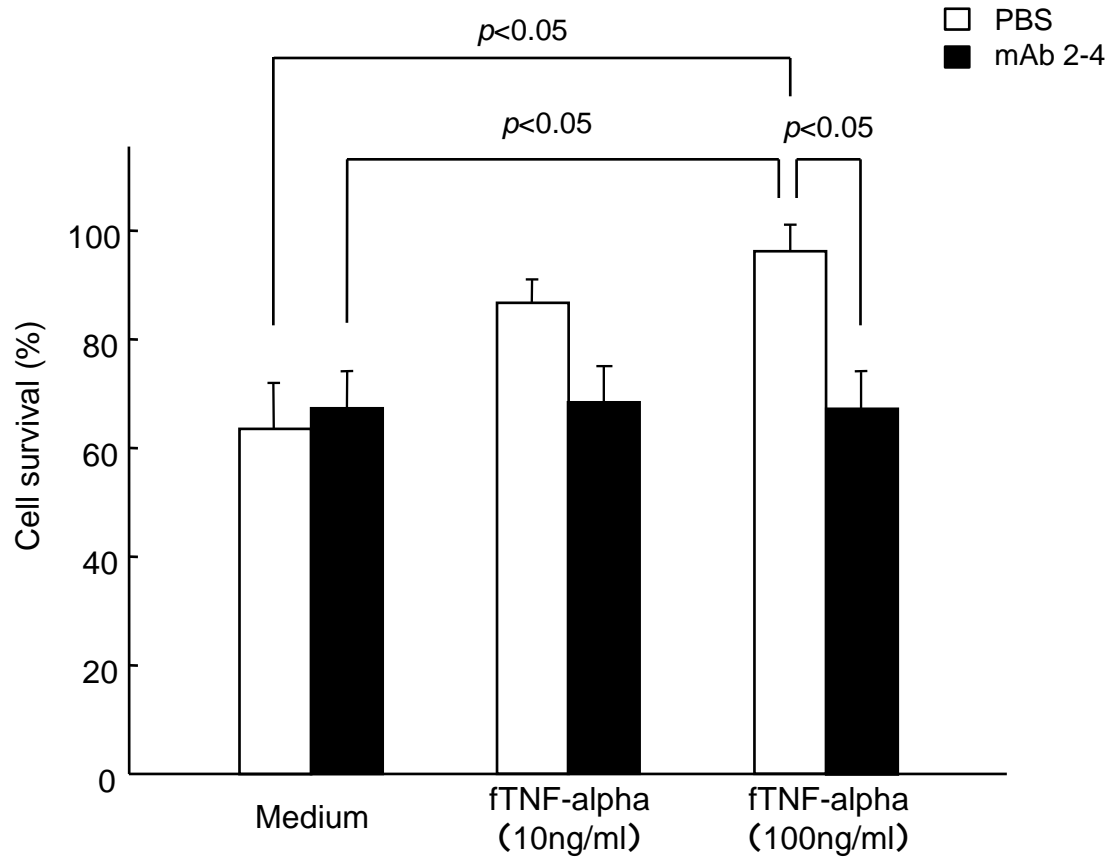
○; mAb 1-1、△; mAb 1-2、□; mAb 1-3、◇; mAb 1-4、●; mAb 2-1、▲; mAb 2-2、■; mAb 2-3、◆; mAb 2-4、○; mAb 3



**図10 天然型fTNF-alphaに対する抗fTNF-alpha mAbの中和活性**

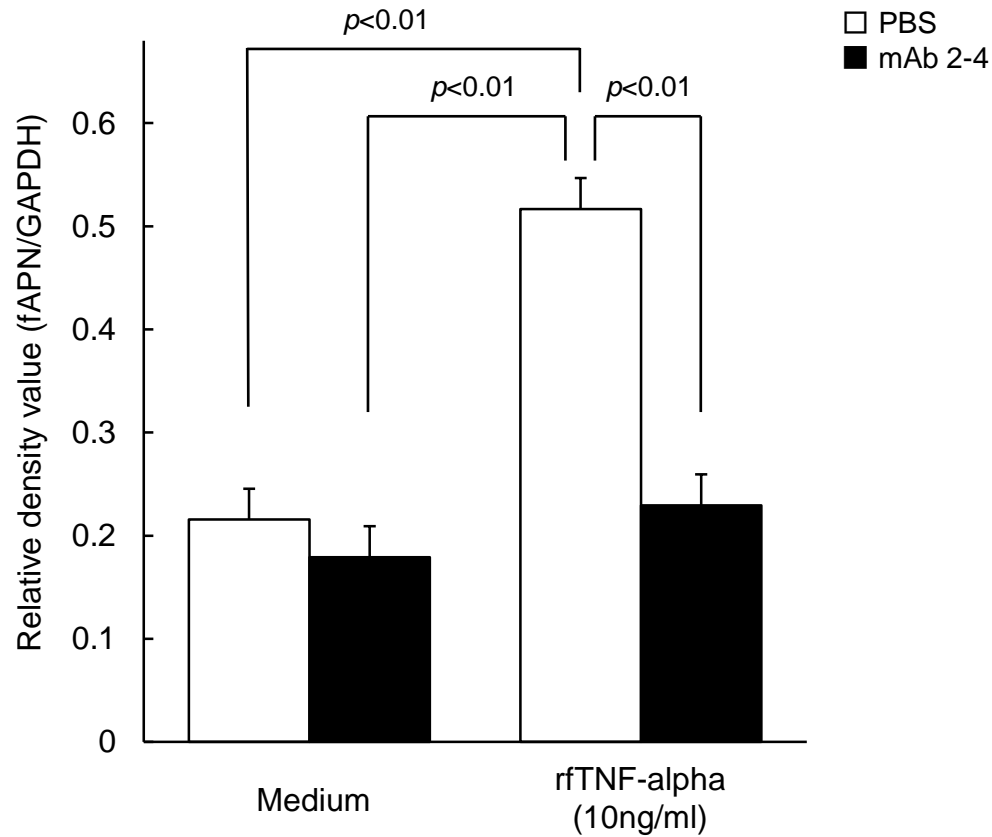
階段希釈した精製抗fTNF-alpha mAbとFIPV感染マクロファージ培養上清を等量混合し37°Cで60分間反応させた。反応させた検体とWEHI-164細胞( $1 \times 10^6$  cells/ml)を各50  $\mu$ l/wellずつ96穴プレートに加え混和し、37°Cで24時間培養した。培養後、WST-8を10  $\mu$ l/well加え、37°C、60分間呈色反応を行った。

□; mAb 1-3、◆; mAb 2-4、○; mAb 3



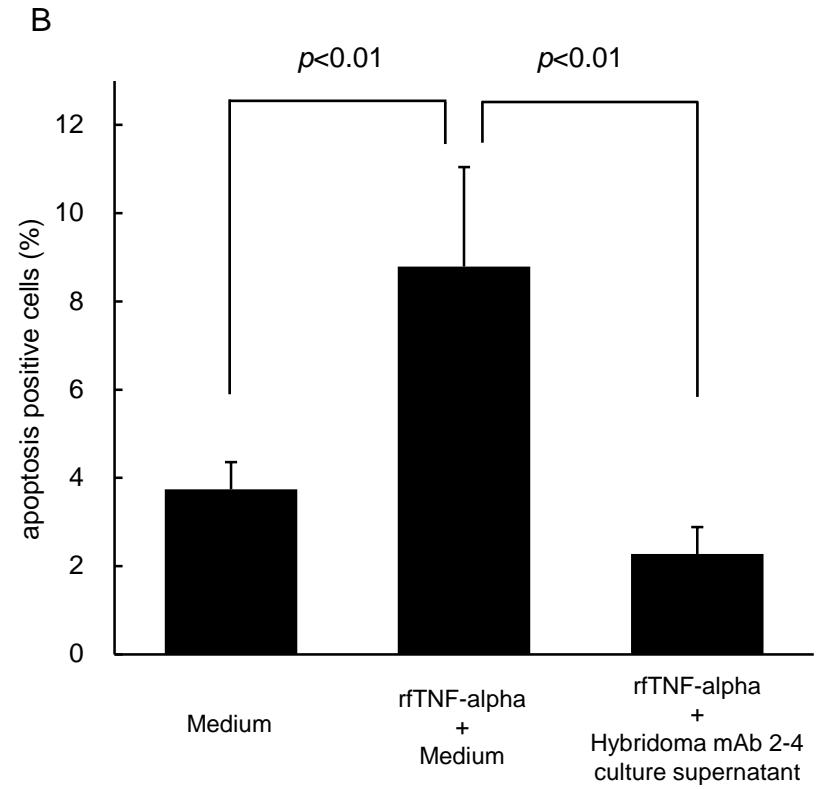
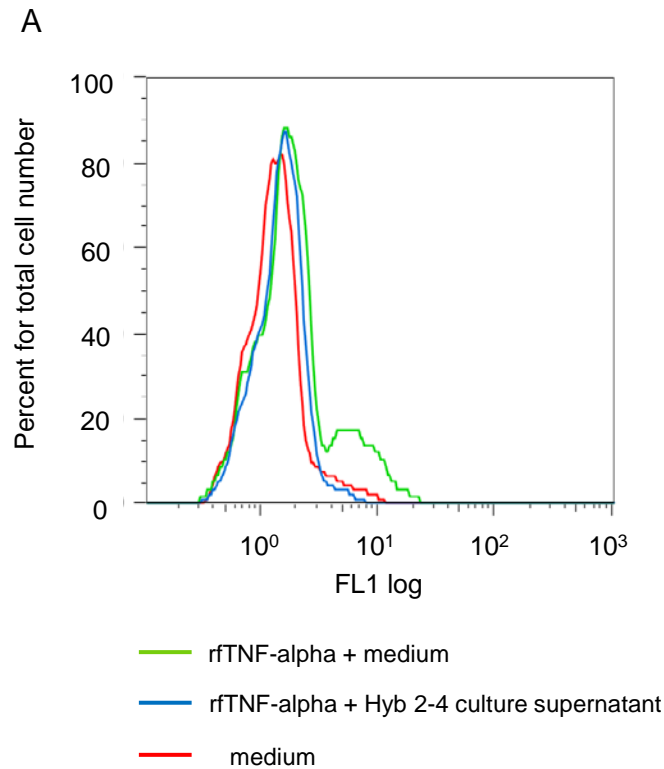
**図11 fTNF-alphaと共培養したFIP発症猫好中球の生存率に対する抗fTNF-alpha mAbの影響**

FIP発症猫由来好中球にmAb 2-4とメジウムまたはmAb 2-4とTNF-alpha (10 または100 ng/ml)を加えて培養した。コントロールとしてmAb 2-4の代わりにPBSを用いた。24時間後における好中球の生存率をWST-assayを行って測定した。



**図12 fTNF-alphaと共培養した猫肺胞マクロファージにおけるfAPN mRNAの発現に対する抗fTNF-alpha mAbの抑制効果**

猫肺胞マクロファージにmAb 2-4とメジウムまたはmAb 2-4とTNF-alpha (10 ng/ml)を加えて培養した。コントロールとしてmAb 2-4の代わりにPBSを用いた。72時間培養後におけるfAPN mRNA発現量を定量した。



### 図13 TNF-alphaがTリンパ球株化細胞に誘導するアポトーシスに対する抗fTNF-alpha mAbの抑制効果

Fet-J細胞にTNF-alphaとmAb 2-4の培養上清の混合液を接種し、4時間培養した。培養後、アポトーシスが誘導された細胞をTUNEL法を用いて染色し、その細胞数をflow cytometryを用いて測定した。

(A)Fet-J細胞の蛍光強度のヒストグラム (B) Fet-J細胞におけるアポトーシス陽性細胞率



## 第 4 章

抗 fTNF- $\alpha$  モノクローナル抗体の FIP に対する治療効果

## 緒論

FIP 発症猫では FIPV に感染したマクロファージから TNF-alpha が過剰に産生されることでその病態が悪化する。FIPV 感染マクロファージから産生された TNF-alpha はリンパ球（特に CD8+T リンパ球）のアポトーシスを誘導するとともに好中球のアポトーシスを抑制する [85, 86]。これらの作用に伴い、リンパ球減少症および好中球の生存率の上昇が認められると考えられる。即ち、FIP の病態悪化には TNF-alpha が深く関与する。

ヒト医学領域においては TNF-alpha が病態悪化に関与する疾患、即ち、関節リウマチや炎症性腸疾患に対して抗 TNF-alpha 抗体を投与することで顕著な治療効果が得られることが確認されている [91]。また、抗 TNF 抗体は致死性のウイルス感染症にも治療効果があることが報告されている。Bolvin らは抗 TNF-alpha 抗体の投与により単純ヘルペス脳症におけるマウスの生存率が増加することを報告している [10]。FIP はウイルス感染症であるとともに fTNF-alpha がその病態悪化に深く関与する。この事実を踏まえると、抗 TNF-alpha 抗体を FIP 発症猫に投与することでその病態を改善することが期待できる [2]。著者は第 3 章において、抗 fTNF-alpha mAb 2-4 を産生するハイブリドーマを樹立した。抗 fTNF-alpha mAb 2-4 は組換えおよび天然型 fTNF-alpha に対して高い中和活性を有する。また、fTNF-alpha により誘導される i) FIP 発症猫由来好中球の生存率の増加、ii) マクロファージにおける fAPN mRNA 発現量の増加、iii) T リンパ球株化細胞に誘導される

アポトーシス、を抑制することを *in vitro* の実験系で示した。  
そこで第 4 章において、抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 の FIP に対する  
治療効果を *in vivo* で調べた。すなわち、SPF 猫に FIPV を実験的  
に感染させ、抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 を投与し FIP の病態および  
生存率が改善するか否かを調べた。

## 材料および方法

### 1. 細胞およびウイルス

抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 を産生するハイブリドーマ細胞は Dulbecco' s modified Eagle' s minimum essential medium にウシ胎仔血清を 10%、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。マウス骨髄腫細胞である WEHI-164 細胞 (ATCC CRL1751) は RPMI 1640 growth medium にウシ胎仔血清を 10%、2-mercaptoethanol を 50  $\mu$  M、polybrene を 2  $\mu$  g/ml、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。細胞は全て 37°C の湿潤条件下で CO<sub>2</sub> 濃度を 5% に設定して培養した。WEHI-164 細胞は ATCC より購入した。II 型 FIPV 79-1146 株は fcwf-4 細胞を用いて 37°C の条件で培養したものを用いた。FIPV 79-1146 株はユトレヒト大学の Dr. M. C. Horzinek より分与を受けた。

### 2. mAb

抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 についてはすでに第 3 章にて記載した。mAb 2-4 は組換えおよび天然型 fTNF- $\alpha$  に対する高い中和活性を有している。

phycoerythrin (PE)-標識抗 feline CD4 mAb (Southern Biotechnology Associates, Inc., U.S.A.) および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 feline CD8 mAb (Southern

Biotechnology Associates Inc.、U.S.A.)は flow cytometry による T リンパ球数の測定に使用した。

### 3. mAb 2-4 の精製

ハイブリドーマの培養上清中に含まれる mAb2-4 を Protein G Sepharose (GE Healthcare.、U.S.A)を用いて精製した。精製は Protein G Sepharose に添付された説明書に従って行った。精製後、Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices (NMWL 30,000; Millipore.、U.S.A.)を用いて mAb 2-4 の緩衝液を PBS (pH 7.4) に置換した。その後、mAb の蛋白質濃度を Bradford 法により測定した。精製した mAb 2-4 の中和活性を WEHI-164 細胞を用いた fTNF-alpha 中和試験により確かめた。方法は第 3 章で示した通りに行った。精製した mAb 2-4 は 10  $\mu$  g/mL の濃度において 160 ng/mL の組換え fTNF-alpha の活性を 80% 以上抑制した。

### 4. ウイルス接種と mAb 2-4 投与計画

6 頭の SPF 猫を無作為に 2 つの群に分けた。猫は当研究室で繁殖させ温度管理された実験動物施設で飼育している SPF 猫を使用した。実験スケジュールを図 14 に示した。II 型 FIPV 79-1146 株 ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml)を猫の皮下に接種した。ウイルス接種 2 週間後に PBS または mAb 2-4 (3 mg/kg)を対照群 (A 群) および抗体投与群 (B 群) の猫にそれぞれ静脈内に投与した。毎日猫の臨床症状を観察し、体温および体重を測定した。毎週ヘパリン加シリンジを用いて採血し、白血球数および白血球の百分比を計測した。FIP 発症の診断は剖検時に、滲出液および各種臓器の化膿性

肉芽腫形成を確認して行った。全ての動物実験は北里大学の動物実験ガイドラインに従って行った (Approval No. 13-087)。

#### 5. 血漿の採取

ヘパリン加シリンジで採血した血液を 3,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を血漿として保存した。血漿は解析時まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 6. 血漿 alpha1-酸性糖蛋白質 (AGP) 濃度の測定

血漿 AGP 濃度を猫 alpha 1 AG プレート (The Institute for Metabolic Ecosystem Lab., Japan) を用いて測定した。手順はキットに添付された説明書に従った。

#### 7. 血漿 vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度の測定

血漿 VEGF 濃度を human VEGF ELISA kit (R & D Systems, U.K.) を用いて測定した。手順はキットに添付された説明書に従った。この ELISA キットは feline VEGF isoform 164 を検出することが可能である [40]。

#### 8. Flow cytometry analysis を用いた T リンパ球数の測定

ヘパリン加血液を PBS で 2 倍に希釈し、Ficoll-Hypaque 溶液 (Axis-Shield PoC AS, Norway) を用いて  $800\text{ xg}$  で 20 分間密度勾配遠心を行った。PBMC 層を回収し PBS で 2 度洗浄後、 $0.1\%$   $\text{NaN}_3$  加 PBS で  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度に浮遊した。細胞に PE-標識抗 feline CD4 mAb および FITC-標識抗 feline CD8 mAb を加え、 $4^{\circ}\text{C}$

で 30 分間反応させた。洗浄後、細胞を fluorescence buffer で浮遊し、flow cytometer (Cytomics FC500、Beckman Coulter、U.S.A.)による解析を行った。細胞の大きさおよび細胞小器官の密度(forward および side scatter)をもとにリンパ球の分画をゲート化して解析した。各検体は 100,000 events まで測定し、T リンパ球の比率を計算した。T リンパ球の絶対数は白血球数にリンパ球の百分比と CD4+および CD8+ T リンパ球の比率をそれぞれ乗じて算出した。

#### 9. Statistical analysis

2 群からなるデータは Student' s t test を用いて解析した。

## 実験成績

### 1. 抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫の血漿 AGP および VEGF 濃度の変化

FIP を発症した猫では血中 AGP および VEGF 濃度が増加することが報告されている [17, 61, 62, 90]。抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 の治療効果を判断するため、FIPV 接種後および mAb 2-4 投与後における血漿 AGP および VEGF 濃度の変化を調べた。

対照群 (A 群) および mAb 2-4 投与群 (B 群) のいずれにおいても FIPV 接種後 7 日目および 14 日目において AGP および VEGF の上昇が認められた (図 15 および 図 16)。FIPV 接種後 14 日目 (mAb 2-4 投与後 0 日目) までは、A 群と B 群の間で AGP および VEGF には有意な差が認められなかった。しかし、FIPV 接種後 21 日目 (mAb 2-4 投与後 7 日目) において B 群の AGP および VEGF 濃度は A 群と比較して有意に低い値を示した。

### 2. 抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫の好中球数および白血球百分比における好中球割合の変化

FIPV 接種後および mAb 2-4 投与後の好中球数の変化を調べた。好中球数はウイルス攻撃後 7 日目において減少傾向が認められたものの、FIPV 接種後 14 日目または 21 日目においてほぼ正常値に回復した (図 17A)。好中球の白血球百分比における割合を図 17B に示した。A 群 (Cat No. A1~A3) の好中球の割合は FIPV 接種後に増加し、FIPV 接種後 21 日目以降も高い割合を維持していた。



一方、No. B1 および No. B2 の猫の好中球の割合は FIPV 接種後 7 日目または 14 日目に増加したが、mAb 2-4 投与 7 日目 (FIPV 接種 21 日目)以降は安定した推移を示した。また、mAb 2-4 を投与して FIP を発症した No. B3 の猫の好中球の割合は、FIPV 接種後 21 日目まで一定の推移を示したが、FIP を発症した FIPV 接種後 28 日目において急激に増加した。

### 3. 抗 fTNF-alpha mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫のリンパ球数および T リンパ球数の変化

FIPV 接種後および mAb 2-4 投与後の末梢血リンパ球数の変化を調べた。ウイルス攻撃後 7 日目では、全ての猫においてリンパ球数の著しい減少が認められた (図 18A)。No. B1 および No. B2 の猫は、mAb 2-4 投与後 7 日目 (FIPV 接種後 21 日目)からリンパ球数の増加が認められ、mAb 2-4 投与後 21 日目 (FIPV 接種後 35 日目)には、は FIPV 接種前と同じ程度まで回復した。一方、FIP を発症した A 群の猫は、ウイルス攻撃後 14 日目以降もリンパ球数の回復が認められず、FIP を発症するまで低い数値を示した。また、mAb 2-4 を投与して FIP を発症した No. B3 の猫は、mAb 2-4 投与後 7 日目 (FIPV 接種後 21 日目)において一時的にリンパ球数の回復が認められたが、FIP 発症時において再び著しい減少が認められた。

FIP を発症した猫ではリンパ球のうち、特に T リンパ球数の減少が認められる。そこで著者は抗 fTNF-alpha mAb 2-4 投与後にこれらの細胞数が回復しているか否かを調べた。A 群および B 群のすべての猫の CD4+ および CD8+ T リンパ球数は、ウイルス接種

後 7 日目に減少した (図 18B および図 18C)。その後、A 群の全ての猫は FIP を発症するまで CD4+ および CD8+ T リンパ球数の減少が認められた。一方、No. B1 および No. B2 の猫の CD4+ および CD8+ T リンパ球数は mAb 2-4 投与後、ウイルス接種前と同じ程度まで回復した。No. B3 の猫は mAb 2-4 投与後も CD4+ および CD8+ T リンパ球数は回復せず FIP を発症した。

#### 4. 抗 fTNF- $\alpha$ mAb 2-4 を投与した FIPV 感染猫における体温、体重、臨床症状および生存率の変化

FIPV 接種後の体温および体重の変化を測定した。FIPV 接種後、A 群および B 群共に発熱が観察された (図 19A)。FIP を発症した 4 頭の猫 (No. A1、No. A2、No. A3 および No. B3) は FIP を発症するまで高い体温を維持していた。一方、No. B2 の猫においては FIPV 接種後 28 日目まで高い体温が観察されたが、それ以降、発熱はほとんど認められなくなり、FIPV 接種後 35 日目以降は体温の変動が安定した。

体重において FIPV 接種後 14 日まで A 群と B 群の間に明確な違いは観察されなかった (図 19B)。FIP を発症した 4 頭の猫 (No. A1、No. A2、No. A3 および No. B3) は持続的な体重の減少が見られた。一方、2 頭の猫 (No. B1 および No. B2) は FIPV 接種後 14 日まで体重の減少が見られたものの、21 日目以降は増加する傾向が認められた。

FIPV 接種後 15 日目から両群において黄疸、沈うつ、食欲減退などの臨床症状が認められた。しかし、B 群では mAb 投与後から改善傾向が認められた。A 群では FIPV 接種後 27 日に 3 頭すべて

を安楽死させたため、生存率が 0 に減少した(図 20)。B 群では 30 日目に 1 頭を安楽死させた。しかしそれ以降は No. B1 および B2 とともに特に臨床症状を示すことなく、65 日目まで生存した。

## 考察

ヒトでは、感染症、免疫介在性疾患および腫瘍の治療に分子標的治療法 (targeted therapy) が行われている [20, 53, 91]。分子標的治療法は病気に関与する因子のみを標的にした治療法であるため、副作用を最小限に抑えて高い治療効果を得ることが可能である。現在、獣医学領域において、分子標的治療法はほとんど実施されていない。特に、犬や猫において、難治性疾患を治療する目的で作製された分子標的薬は存在しない。今回、我々は FIP の病態悪化因子の一つである fTNF-alpha を中和する抗体を FIP 発症猫に投与して、治療効果が認められるか否かを調べた。即ち、FIP 発症猫において fTNF-alpha を標的とした抗体治療を行い、症状の改善が認められるか否かを検討した。

過去の実験で経時的に採取した血漿を用いて、TNF-alpha、VEGF および AGP 濃度を測定したところ、FIPV 接種後 7-14 日目において各因子の有意な上昇が認められた。また、全ての猫において、FIPV 接種後 6-8 日目に臨床症状 (発熱、沈鬱、黄疸など) が認められた。これらの事実を総合的に判断して、II 型 FIPV 79-1146 株接種 14 日後において抗 fTNF-alpha mAb 2-4 を猫に投与した。

mAb 2-4 を投与した猫では 3 頭中 2 頭において FIP への進行が抑制された。一方、対照群の猫では、3 頭全てが FIP を発症した。mAb 2-4 を投与した猫では、抗体投与後に血漿 VEGF 濃度の改善が認められるとともに、リンパ球数の回復も認められた。加えて、血漿 AGP 濃度は FIP の診断の基準となる  $1,500 \mu\text{g/mL}$  [1] を超え

ていたが、mAb 2-4 投与群では 21 日目以降、有意に低い値を示した。即ち、mAb 2-4 の投与は、fTNF-alpha の活性を抑制することで FIP の症状を緩和することが強く示唆された。

FIP 発症猫において、体内の FIPV を排除するためには、CD4+ および CD8+ T リンパ球による細胞性免疫の誘導が重要であることが知られている [16]。Takano らは、FIPV 感染マクロファージから産生された fTNF-alpha が T リンパ球、特に CD8+ T リンパ球のアポトーシスを効率よく誘導することを報告した [86]。今回の実験では、FIPV 接種後 7 日目から CD4+ および CD8+ T リンパ球数の減少が認められた。しかし、mAb 2-4 を投与した 3 頭中 2 頭は、CD4+ および CD8+ T リンパ球数の回復が認められた。この理由として、fTNF-alpha による CD4+ および CD8+ T リンパ球へのアポトーシス誘導が、投与した mAb 2-4 の作用により減弱した可能性が考えられた。

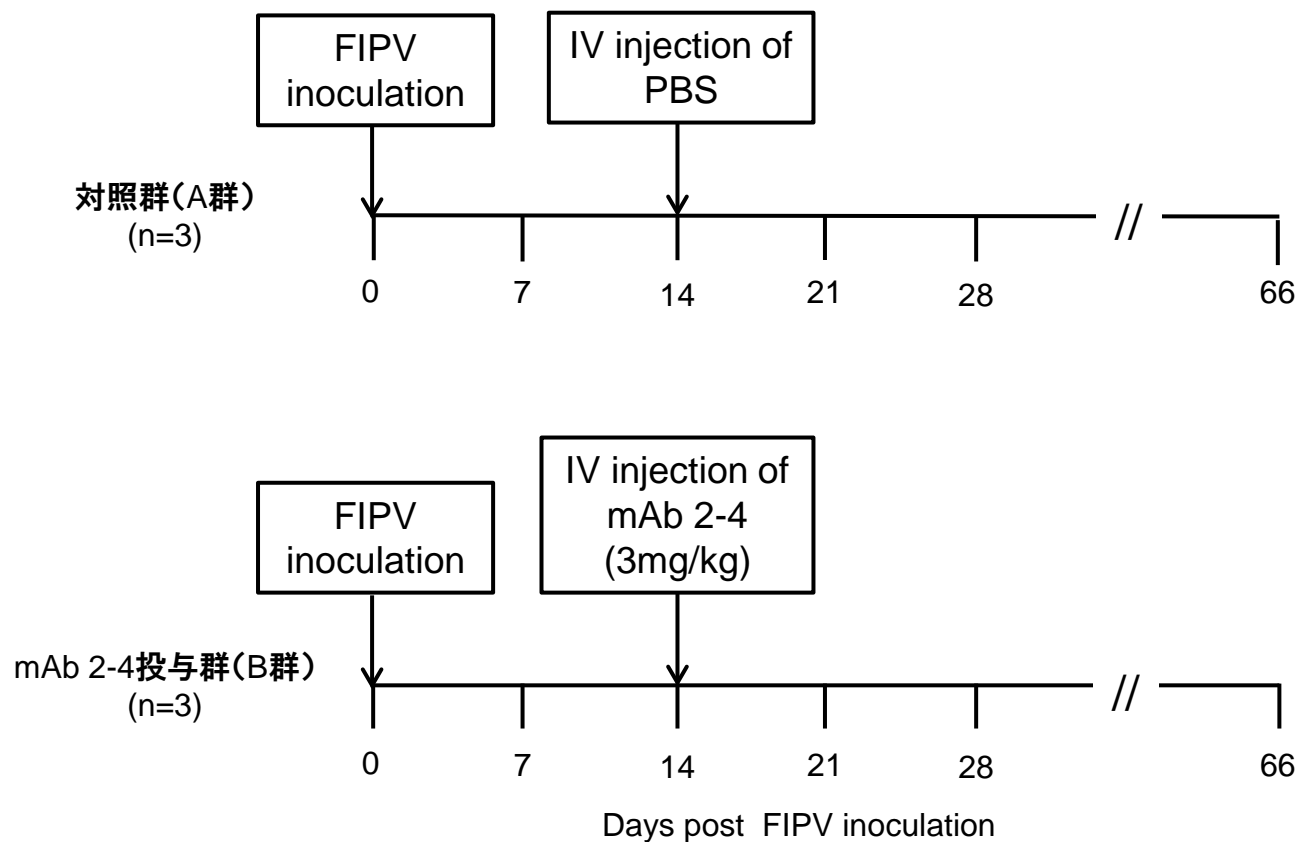
これまで、FIP の治療に対して様々な治療薬が検討されてきた。FIP はウイルス性疾患であることから、抗ウイルス薬を用いた治療法も検討されている [23]。一方、FIP は炎症性疾患であることから、steroids に代表される免疫抑制剤を使用した治療も検討されている。しかし、既存の抗ウイルス薬および免疫抑制剤はいずれも FIP の症状を一過性に改善するものの、生存期間および quality of life を改善することはできない [23]。今回、mAb 2-4 を投与した FIP 発症猫では、生存期間および quality of life が改善した。しかし、mAb 2-4 を投与した猫では 3 頭中 1 頭が FIP を発症した事実を踏まえると、FIP の治療薬として臨床応用するには更なる検討が必要である。著者は上記の抗ウイルス薬と mAb

2-4 を併用することで、FIP の治療効果を向上させることが出来ると考えている。単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染において抗 TNF- $\alpha$  抗体と抗 HSV 薬を併用した場合、併用しない場合と比較して高い治療効果が認められている [10]。HSV の場合、ウイルスの増殖に不可欠な因子のみを標的とした anti-HSV drug がすでに開発されている。近年、FIPV でも、そのような薬剤が開発されており、今後の研究が期待されている [36]。今後はこのような薬剤と mAb 2-4 を併用することで FIP の治療効果が上昇するか否かを検討する必要がある。

今回実験では、mouse monoclonal antibody である mAb 2-4 を単回投与することで症状の改善が認められた。しかし、No.B3 の猫のように一時的な効果しか観察されない個体や再発した猫に対しては mAb 2-4 を複数回投与しなければならない可能性が考えられた。その場合、副作用としてアナフィラキシー反応の惹起、効果の減弱そして半減期の減少が推察される。Umehashi らは、定常領域を猫化した mAb (マウス-猫キメラ抗体) を猫に投与した場合、アナフィラキシー反応を誘導しないことを報告した [94]。今後、mAb 2-4 の mouse-feline chimeric antibody への改変および anti-FIPV agent(s) と併用した場合の治療効果の検討を行い、FIP に対する有効な治療法を確立することが望まれる。

## 小括

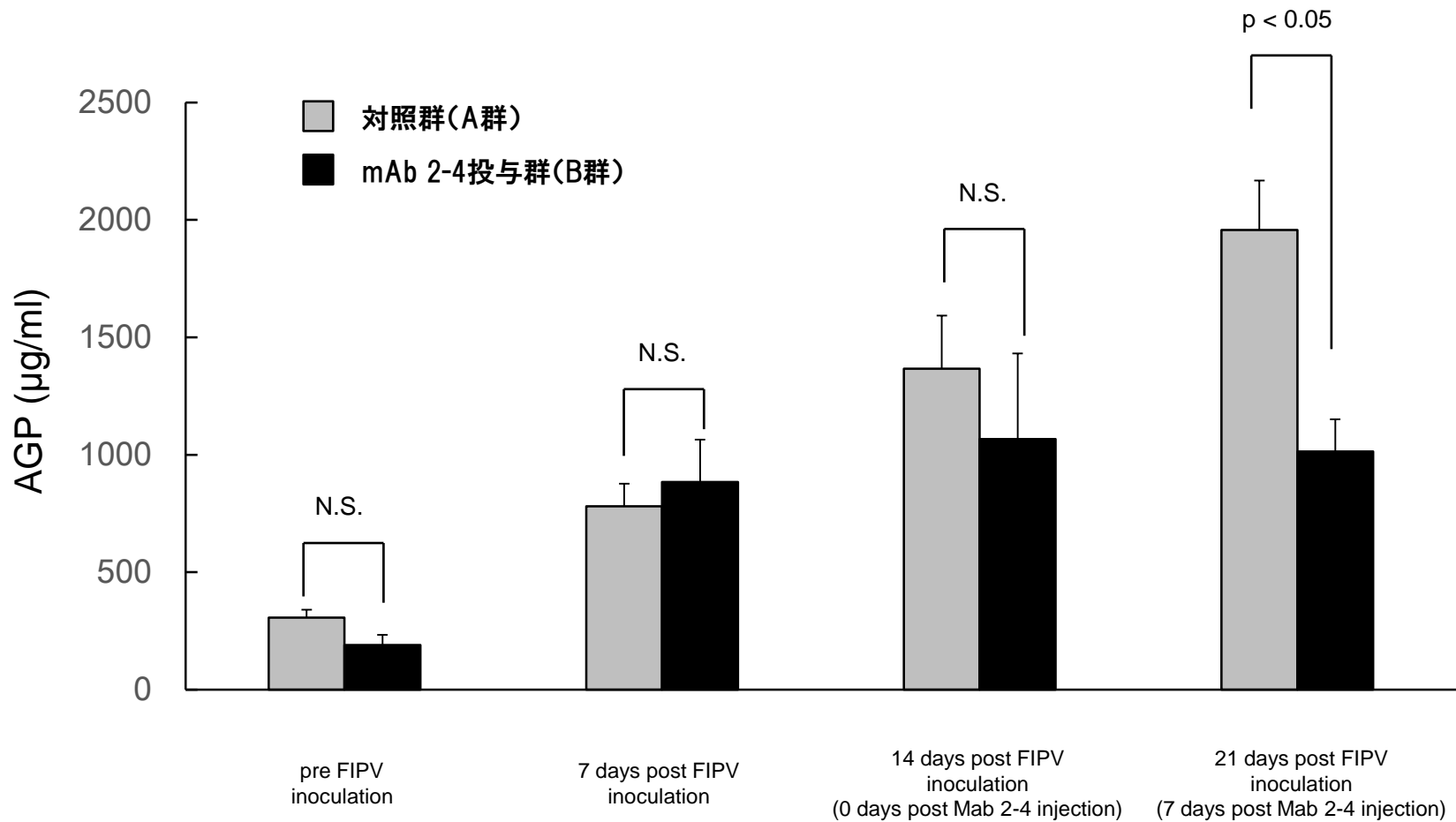
マクロファージ・単球における FIPV の複製が fTNF-alpha の産生を増加させる。この FIPV 感染マクロファージから産生される fTNF-alpha はリンパ球減少症および好中球の増多症を誘導する。加えて、fTNF-alpha は II 型 FIPV のウイルスレセプターである APN の発現量を増加させる。著者は第 3 章において、抗 fTNF-alpha mAb を作出した。さらに、作出した抗 fTNF-alpha mAb 2-4 は fTNF-alpha が誘導する FIP の病態悪化を抑制することを *in vitro* で示した。そこで第 4 章において、FIPV を実験感染させた SPF 猫に mAb 2-4 を投与することで、mAb 2-4 が FIP の病態の進行および生存率を改善するか否かを調べた。過去の感染実験に用いた猫の臨床症状発現時期を総合的に判断して、FIPV 接種 2 週間後に mAb 2-4 を投与した。mAb 2-4 を投与した 3 頭の猫のうち 2 頭は FIP を発症しなかったが、対象群 3 頭の猫においては全てが FIP を発症した。血漿 AGP および VEGF 濃度は mAb 2-4 投与後に低下した。加えて、末梢血中リンパ球数は mAb 2-4 投与後に回復していた。これらの結果から、抗 fTNF-alpha mAb は FIP の治療に有効であることが強く示唆された。今後、mAb 2-4 の mouse-feline chimeric antibody への改変および anti-FIPV agent(s) と併用した場合の治療効果の検討を行い、FIP に対する有効な治療法を確立することが望まれる。



**図14 ウイルス接種とmAb 2-4投与計画**

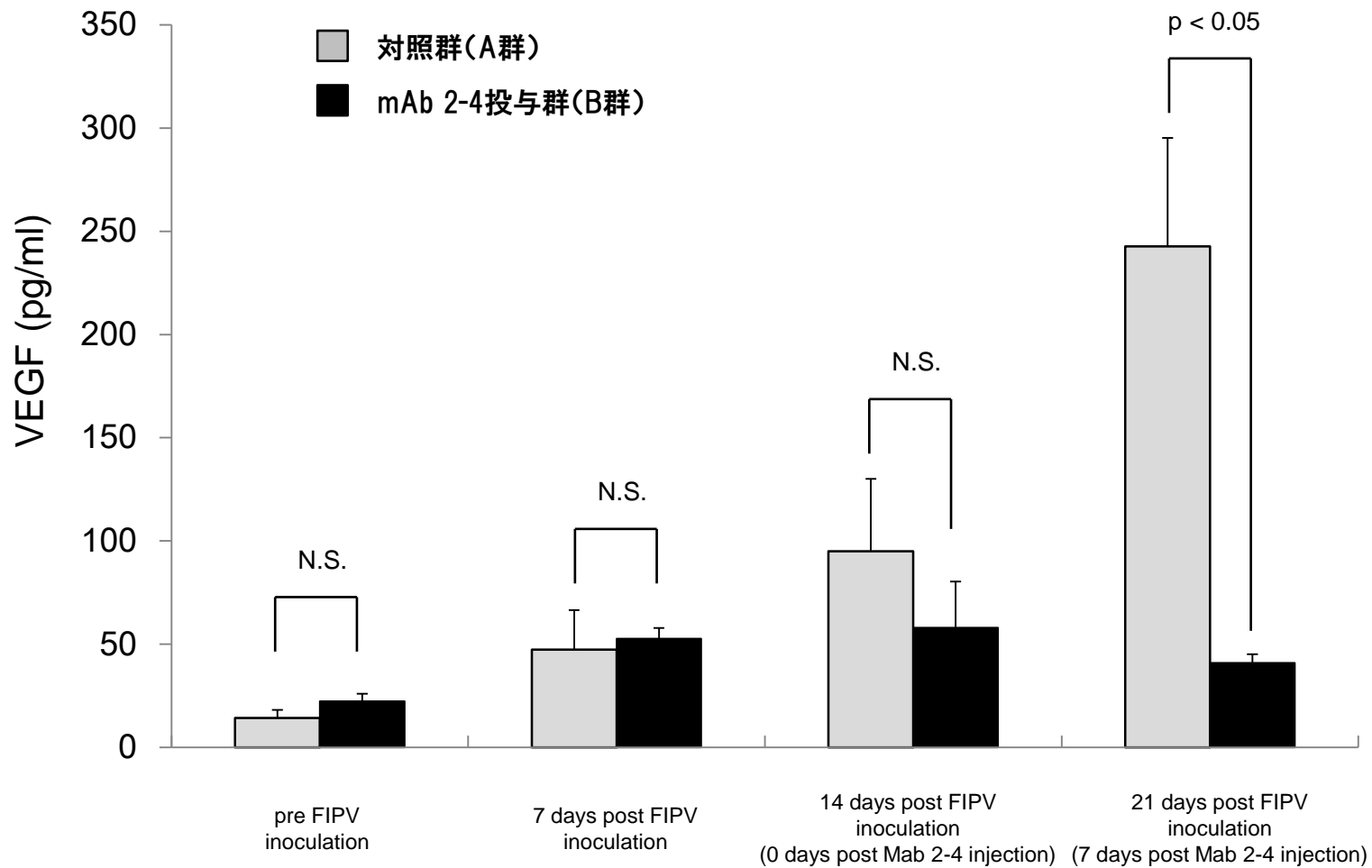
6頭のSPF猫を無作為に2つの群に分けた。II型 FIPV 79-1146株 ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml)を猫の皮下に接種した。ウイルス接種2週間後にPBSまたはmAb 2-4 (3 mg/kg)を対照群(A群)および抗体投与群(B群)の猫に対してそれぞれ静脈内に投与した。毎日猫の臨床症状を観察し、体温および体重を測定した。毎週猫からヘパリン加シリンジを用いて採血し、血球計測および血漿の分離を行った。





**図15 抗tTNF-alpha mAb 2-4を投与したFIPV感染猫の血漿AGP濃度の変化**

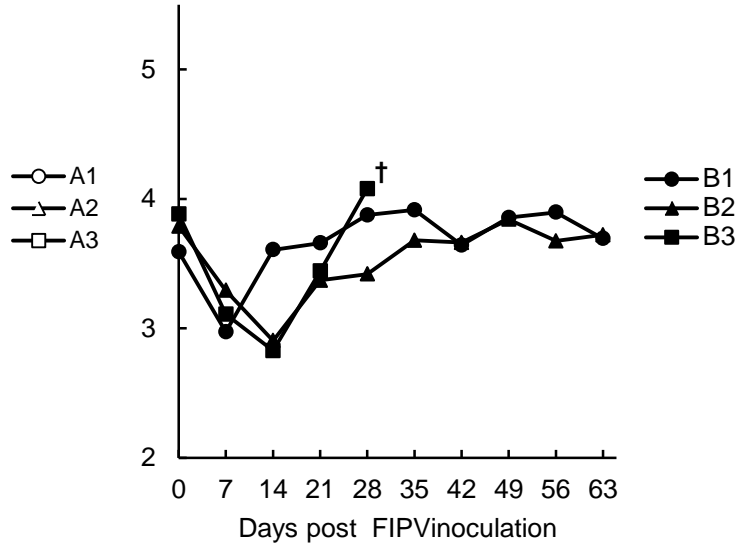
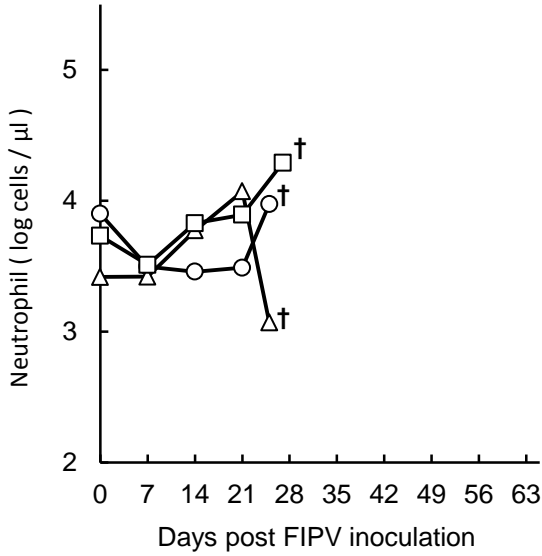
FIP感染猫の血漿AGP濃度を一元放射免疫拡散法を応用したキットを用いて測定した。  
 正常猫における血漿AGPの基準値;  $386 \pm 60 \mu\text{g/ml}$  (測定kitに添付された資料より引用; mean  $\pm$  S.D.).  
 N.S.: not significant.



**図16 抗TNF-alpha mAb 2-4を投与したFIPV感染猫の血漿VEGF濃度の変化**

FIPV感染猫の血漿VEGF濃度をELISA測定キットを用いて定量した。N.S.: not significant

A



B

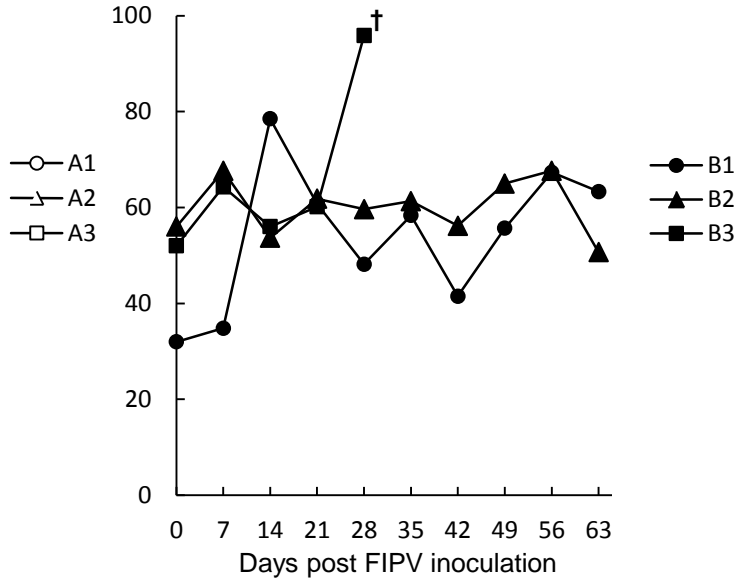
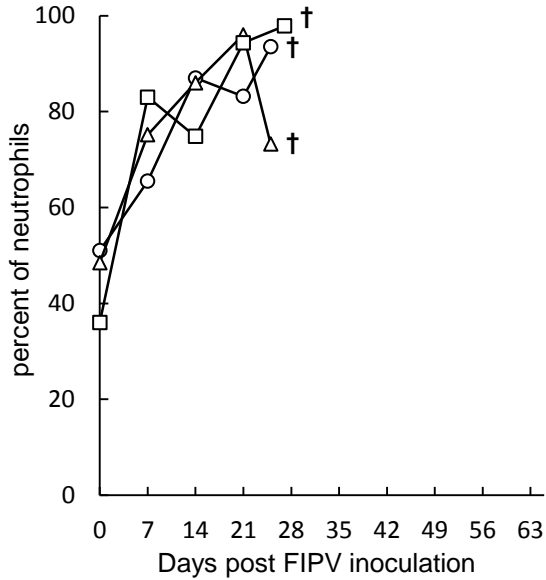
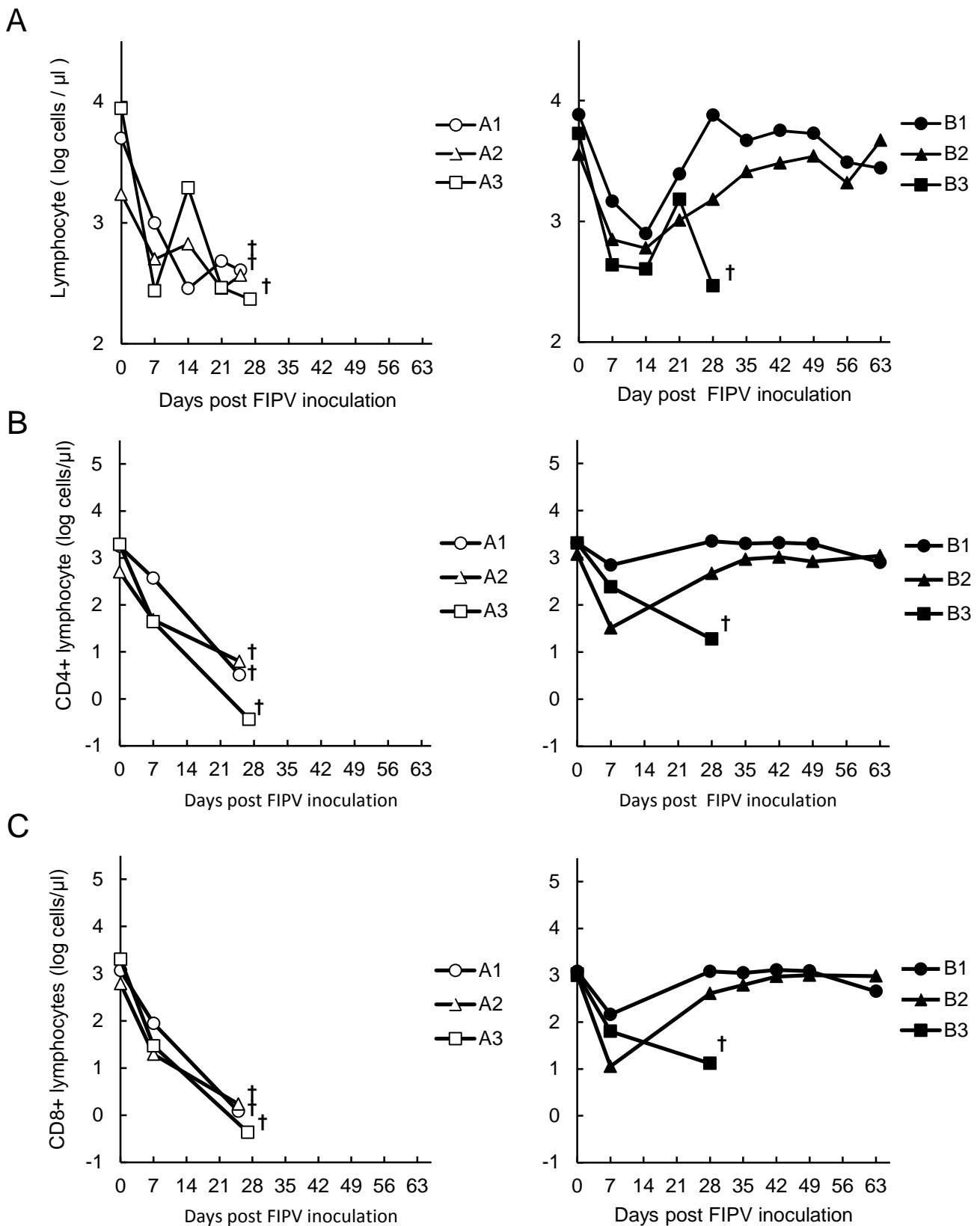


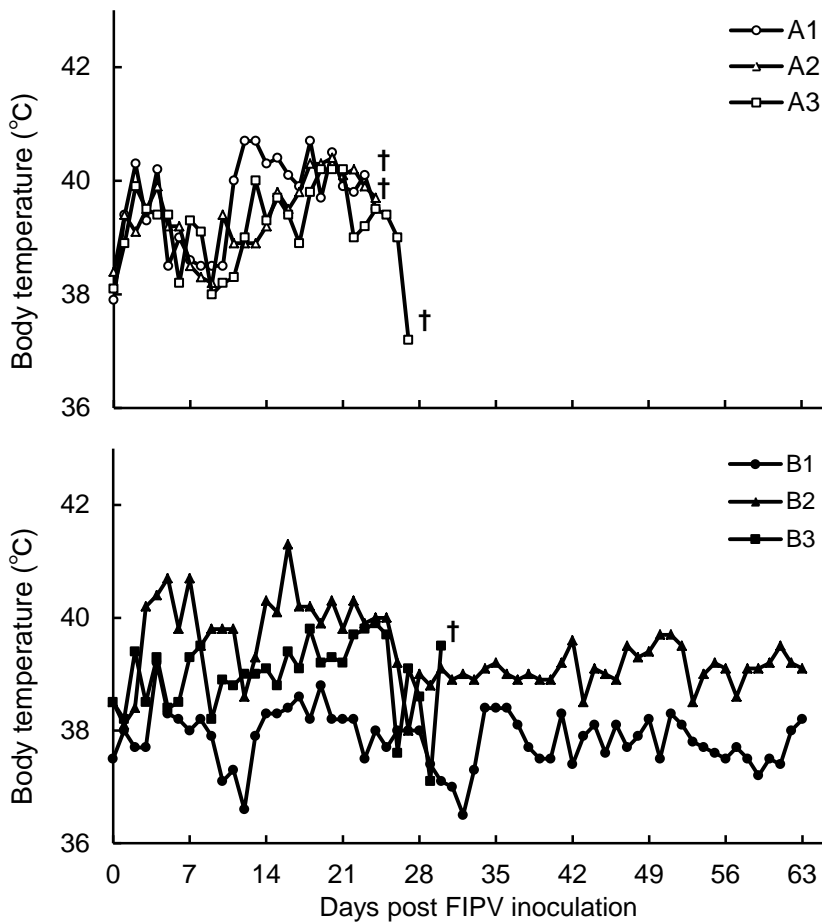
図17 抗tTNF-alpha mAb 2-4を投与したFIPV感染猫の好中球数および白血球百分比における好中球割合の変化

(A) 末梢血好中球数 (B) 白血球百分比における好中球の割合 †: 安楽死処置



**図18 抗TNF- $\alpha$  mAb 2-4を投与したFIPV感染猫のリンパ球数およびTリンパ球数の変化**  
 (A)末梢血リンパ球数 (B) 末梢血CD4+Tリンパ球数 (C) 末梢血CD8+Tリンパ球数 †: 安楽死処置

A



B

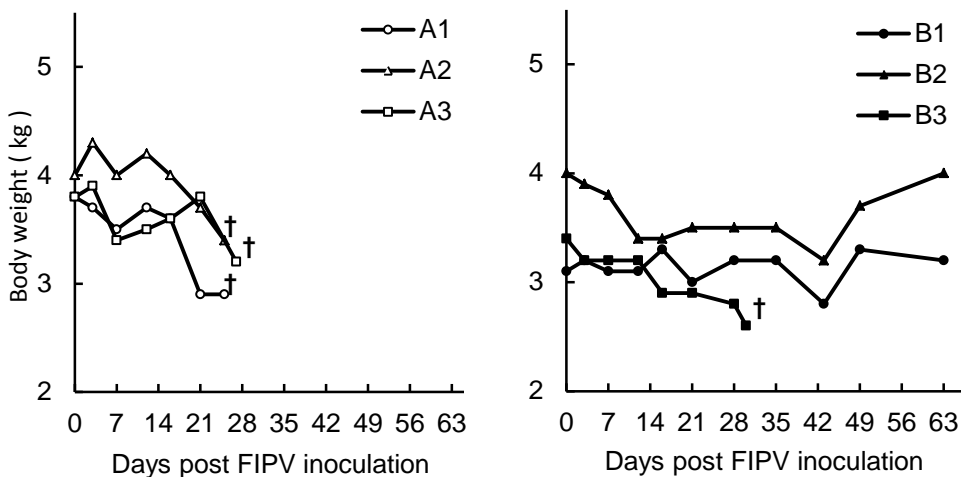
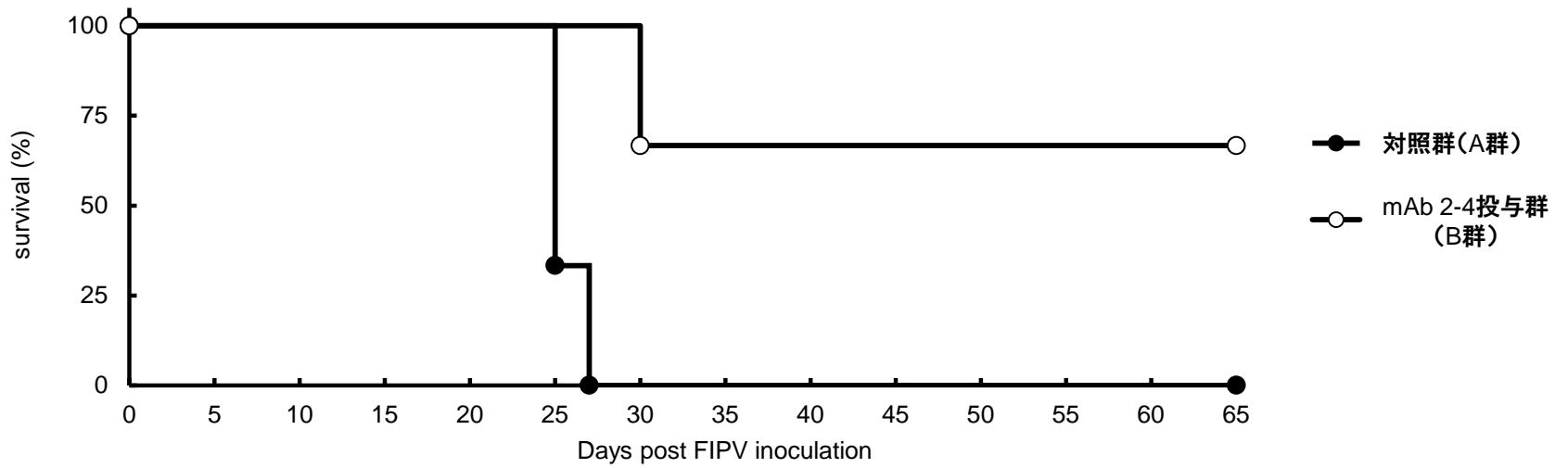


図19 抗fTNF-alpha mAb 2-4を投与したFIPV感染猫における体温および体重の変化  
 (A) 体温 (B) 体重 †: 安楽死処置



**図20 抗fTNF-alpha mAb 2-4を投与したFIPV感染猫における生存率**  
人道的エンドポイントに達し生存の見込みが無くなった個体を安楽死させた。

## 第 5 章

抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 の  
mouse-feline chimeric mAb への改変

## 緒論

FIPは猫科動物における致死性伝染性疾患である。これまでの研究報告から、FIPの病態悪化に炎症性サイトカインであるfTNF-alphaが深く関わっていることが明らかとなっている[85-87]。ヒト医学領域においてはTNF-alphaが病態悪化に関与する疾患、即ち、関節リウマチや炎症性腸疾患に対して抗TNF-alpha抗体を投与することで顕著な治療効果が得られることが確認されている[91]。また、抗TNF抗体は致死性のウイルス感染症にも治療効果があることが報告されている[10]。これらの事を踏まえると、fTNF-alphaを中和する抗体をFIP発症猫に投与することでFIPの進行を抑制できる可能性が考えられる。著者は、第3章においてfTNF-alphaに対して高い中和活性を有する抗fTNF-alpha mouse mAb 2-4を産生するハイブリドーマを樹立した。さらにFIPVをSPF猫に実験感染させた後、抗fTNF-alpha mouse mAb 2-4を投与することによってFIPの病態悪化を軽減することが可能であることを第4章において明らかにした。しかし、本抗体はマウス由来の抗体であり猫に対して異種タンパク質である。即ち、猫に繰り返し投与した際に様々な副作用が生じることが懸念される。

ヒトでは、関節リウマチの治療薬としてinfliximabが使用されている[91]。本抗体はmouse mAbの可変領域とヒト抗体の定常領域を融合させたmouse-human chimeric mAbである。mouse-human chimeric mAbはmouse mAbと比較してhuman anti-mouse



antibodies response が低下しており、投与時に生じる副作用も減弱している。以上を踏まえると、抗 fTNF- alpha mouse mAb 2-4 の定常領域のアミノ酸配列を猫抗体の定常領域のアミノ酸配列に置換すれば、feline anti-mouse antibodies response および投与時における副作用を軽減できることが推察される。そこで著者は第 5 章において、抗 fTNF-alpha mouse mAb 2-4 の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させた mouse-feline chimeric mAb(chimeric mAb 2-4)を作製し、その fTNF-alpha に対する中和活性を確かめた。また、精製した mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 を猫に反復投与し、feline anti-mouse antibody response の誘導能の変化を調べた。

## 材料および方法

### 1. 細胞

ハイブリドーマ mAb 2-4 および FO 細胞は Dulbecco' s modified Eagle' s minimum essential medium にウシ胎仔血清を 10%、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。マウス骨髄腫細胞である WEHI-164 細胞は RPMI 1640 medium にウシ胎仔血清を 10%、2-メルカプトエタノールを 50  $\mu$  M、polybrene を 2  $\mu$  g/ml、ペニシリンを 100 unit/ml、ストレプトマイシンを 100 mg/ml 加えたものを用いて培養した。細胞は全て 37°C の湿潤条件下で CO<sub>2</sub> 濃度を 5% に設定して培養した。FO 細胞 (ATCC CRL1646) および WEHI-164 細胞 (ATCC CRL1751) は ATCC より購入した。

### 2. mAb 2-4 可変領域および猫イムノグロブリン定常領域のクローニング

RNA の抽出および cDNA 合成の手順は Takano らの方法に従った [87]。mAb 2-4 の可変領域遺伝子 (VH および VL) をハイブリドーマ mAb 2-4 の mRNA の cDNA より PCR で増幅した。猫イムノグロブリン重鎖の定常領域 (CH) 遺伝子は猫末梢血単核球 mRNA の cDNA より増幅した。猫イムノグロブリン軽鎖の定常領域 (CL) 遺伝子は公表されている配列 (Genbank AF198257.1) をもとに Life technologies (U. S. A.) にて人工的に合成した。この合成 DNA を組み込んだ plasmid (pMA-T) をテンプレートとして CL を増幅した。

PCR に用いた primer sequences を表 4 に示した。VH、VL、CH および CL は Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Life technologies、U.S.A.) を用いて pCR-blunt II-TOPO vector にそれぞれクローニングした。

### 3. Chimeric mAb 2-4 発現ベクターの構築と発現株の作製

pCR-bluntII-TOPO vector 上にある CH および CL 遺伝子と VH および VL の fragment を Bam HI-Linker を用いてそれぞれ連結し chimeric mAb 2-4 の重鎖および軽鎖を作製した(図 21)。chimeric mAb 2-4 重鎖の fragment を pCDNA3.1(+)/Neo expression vector に EcoRI を用いて挿入した。chimeric mAb 2-4 軽鎖の fragment は pCDNA3.1(+)/Hygro expression vector に HindIII および EcoRV を用いて挿入した。F0 細胞に lipofectamine 2000 (Life technologies、U.S.A.) を用いて重鎖および軽鎖の発現ベクターをコトランスフェクションした。トランスフェクション後、F0 細胞を G418 (Roche Diagnostics、Switzerland) および hygromycin B (Roche Diagnostics、Switzerland) を加えたメジウムで培養し、安定発現細胞株 (FOCM24) を得た。FOCM24 細胞は限界希釈法を用いて 2 回クローニングした

### 4. mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の精製

mouse mAb 2-4 はハイブリドーマ mAb 2-4 の培養上清から Protein G Sepharose (GE Healthcare、U.S.A.) を用いて精製した。Chimeric mAb 2-4 は FOCM24 の培養上清から Protein A Sepharose (GE Health acre、U.S.A.) を用いて精製した。精製

は Protein G Sepharose および Protein A Sepharose に添付された説明書に従って行った。精製後、Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices (NMWL 30,000; Millipore、U.S.A.)を用いて mAb の緩衝液を PBS (pH 7.4)に置換した。その後、mAb の蛋白質濃度を Bradford 法により測定した。

#### 5. Western immunoblotting assay

精製した mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 を非還元条件 (non-reducing condition) および還元条件 (reducing condition) で変性処理した。非還元条件として、mAb と SDS 溶液を混和し、室温で 5 分間インキュベートした。また、還元条件として mAb と 2-メルカプトエタノール加 SDS 溶液を混和し、100℃、10 分間インキュベートした。mAb を 15 %ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。転写後、転写膜を 5% スキムミルク加 TBST (20 mM Tris-HCl、pH 8.0、0.88 % NaCl、0.05 % Tween-20) に浸漬し 37℃ で 60 分間ブロッキング反応を行った。洗浄後、horseradish peroxidase 標識抗 mouse IgG (H+L chain specific) ヤギ抗体または horseradish peroxidase 標識抗 feline IgG (whole molecular) ヤギ抗体 (MP Biomedicals、U.S.A.) と 37℃、60 分間反応させた。その後、転写膜を基質液に 10 分間浸漬し、呈色反応を行った。

#### 6. マウス線維肉腫細胞 (WEHI-164 細胞) を用いた精製 mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和活性の測定

精製 mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和活性を第 3 章で行った WEHI-164 細胞を用いた fTNF-alpha 中和試験と同様の方法で測定した。WEHI-164 細胞を 1  $\mu$ g/ml の Actinomycin D (Sigma Lab.、U.S.A.) を添加した希釈用培地で浮遊し、37°C で 3 時間インキュベートした。階段希釈した mAb を 40 ng/ml の組換え fTNF-alpha または FIPV 発症猫由来の腹水 (天然型 fTNF-alpha) と混和後、37°C で 1 時間インキュベートした。Actinomycin D 加培地で 3 時間インキュベートした細胞を 96 穴プレートに 50  $\mu$ l ずつ播種し、そこに反応後の混合物を 50  $\mu$ l ずつ加え、37°C で 24 時間培養した。培養後、10  $\mu$ l の WST-8 溶液 (WST-8 cell proliferation assay kit; Kishida Chemical Co.、Ltd.、Japan) を各ウェルに加え、37°C で 1 時間呈色反応を行った。反応後、波長 450nm における吸光度を測定した。中和率は以下の計算式に従って算出した: Neutralization (%) = (mAb とサンプルを含むウェルの O.D. 値 - サンプルのみを含むウェルの O.D. 値) / mAb とサンプルを含まないウェルの O.D. 値 x 100.

## 7. 猫に対する反復投与試験

mAb の反復投与試験は Umehashi らの方法を参考に行った [94]。2 ヶ月齢の SPF 猫 5 頭に対して精製した mouse mAb 2-4、chimeric mAb 2-4 または対照として PBS を投与した。Medetomidine (Domitor、Orion Corporation、Finland) で鎮静化した SPF 猫の頸部静脈内に低用量 (1mg/kg) および高用量 (5mg/kg) の mAb を 2 週間隔または 4 週間隔で 4 回投与した。投与直前に SPF 猫から血清を採取した。mAb の投与前および投与 10 分後に全自動電子血圧計 (pettrust、

Aster Llectric Co.、Japan)を用いて、前腕部または尾根部で血圧および脈拍数を測定した。測定は3回行った。全ての動物実験は北里大学の動物実験ガイドラインに従って行った(Approval No.14-045)。

8. mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 を投与した猫の血清と反応させた mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 の中和活性の変化

mAb の fTNF-alpha に対する中和試験の結果から、10 ng/ml の組換え fTNF-alpha を 80%以上中和する最少濃度の mAb の濃度を 1 単位とした。mAb 投与猫血清と mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 (最終濃度 1 単位) を 1 時間反応させた。その後、各反応物に組換え fTNF-alpha (最終濃度 10 ng/ml)を加えた。さらに 1 時間後、反応物を WEHI-164 細胞に接種した。24 時間後における fTNF-alpha の WEHI-164 細胞の細胞傷害率を WST-8 assay を行って測定し、mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和活性を算出した。

## 実験成績

### 1. mAb 2-4 可変領域および猫イムノグロブリン定常領域のクローニング

ハイブリドーマ mAb 2-4 mRNA の cDNA から VH 遺伝子 (414 bp) および VL 遺伝子 (378 bp) を増幅した (図 22)。また、PBMC mRNA の cDNA から CH 遺伝子 (1005 bp) を増幅した。CL 遺伝子 (330 bp) は既知の CL 遺伝子を含むプラスミドをテンプレートとして増幅した。それぞれの PCR 産物を pCR-blunt II-TOPO vector にクローニングした後、塩基配列を解析した。VH 遺伝子と CH 遺伝子を連結した後、pCDNA 3.1(+)/Neo expression vector にライゲーションした。この組換えプラスミドの塩基配列を確認した (図 23)。塩基配列を基にしてアミノ酸配列を推定したところ、可変領域が mAb 2-4、定常領域が猫イムノグロブリン重鎖の特徴を持つことが確認された。VL 遺伝子と CL 遺伝子についても塩基配列を解析した。塩基配列を基にしてアミノ酸配列を推定したところ、可変領域が mAb 2-4、定常領域が猫イムノグロブリン軽鎖の特徴を持つことが確認された (図 24)。

### 2. 精製 mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の western blot analysis

Chimeric mAb 2-4 を精製した後、mouse mAb 2-4 と共に western blotting で解析した。還元していない mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 の場合、分子量 135 kDa 以上の位置にスメア状

のバンドが認められた(図 25A)。detection antibody として抗 mouse IgG 抗体を用いた場合、mouse mAb 2-4 の lane にはバンドが認められたが、chimeric mAb 2-4 の lane にはバンドは認められなかった。一方、detection antibody として抗 feline IgG 抗体を用いた場合、chimeric mAb 2-4 の lane にはバンドが認められたが、mouse mAb 2-4 の lane には認められなかった。

還元した mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 を泳動した場合、分子量 50 kDa および 25 kDa 付近にバンドが認められた(図 25B)。detection antibody として抗 mouse IgG antibody を用いた場合には mouse mAb 2-4 の 50 kDa および 25 kDa のバンドが認められた。Chimeric mAb 2-4 の lane ではバンドは認められなかった。Detection antibody として抗 feline IgG 抗体を用いた場合には mouse mAb 2-4 の 25 kDa 付近のバンドと chimeric mAb 2-4 の 50 kDa および 25 kDa の位置にバンドが認められた。

### 3. mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和活性

精製 mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和活性を第 3 章で実施した中和試験と同様の方法で測定した。mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 は組換え fTNF-alpha の WEHI-164 細胞に対する細胞傷害活性を濃度依存的に中和した(図 26A)。同様に、FIP 発症猫由来腹水中に含まれる天然型 fTNF-alpha に対する mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の中和活性を確かめた。Mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 は



FIP発症猫由来腹水による WEHI-164細胞に対する細胞傷害活性を濃度依存的に中和した(図 26B)。

4. 反復投与試験による副反応および mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 を投与した猫の血清と反応させた mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 の中和活性の変化

精製した mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 を 2 または 4 週間隔で SPF 猫に繰り返し投与し、投与前後の血圧および脈拍数を測定した(表 5)。5 回の投与を通して、PBS、mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 投与後に体温が低下する傾向が観察されたが、3 群間で有意な差は認められなかった。血圧および脈拍数においても、投与物および投与回数による差は認められず、3 群間で有意な差はなかった。

PBS、mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 を投与した猫の血清を経時的に採取した。採取した血清を mouse mAb 2-4 または chimeric mAb 2-4 と反応させ、mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 の fTNF- $\alpha$  に対する中和活性の変化を測定した。1 または 5 mg/kg の mouse mAb 2-4 を投与した猫の血清と mouse mAb 2-4 を反応させた場合、mouse mAb 2-4 の中和活性は低下した(図 27A)。しかし、対照として PBS を投与した猫の血清と mouse mAb 2-4 と反応させた場合は mouse mAb 2-4 の中和活性の低下は認められなかった。

1 mg/kg の chimeric mAb 2-4 を投与した猫の血清と chimeric mAb 2-4 と反応させた場合、PBS 投与猫血清と同様に chimeric mAb 2-4 の中和活性の低下は認められなかった(図 27B)。5mg/kg の

chimeric mAb 2-4 を投与した猫においては 3 回目投与時以降 (初回投与後 28 日目以降) の血清を chimeric mAb 2-4 と反応させた場合、chimeric mAb 2-4 の中和活性が低下した (図 27B)。

## 考察

FIPはFIPVにより引き起こされる致死性炎症性疾患である。これまでFIPにおける全身性の炎症に対して、steroidsに代表される免疫抑制剤を使用した治療が実施されてきた。しかし、既存の免疫抑制剤ではFIPの症状が一過性に改善するものの、生存期間およびquality of lifeを改善することはできなかった[23]。一方、著者は第4章において炎症性サイトカインであるfTNF-alphaの生理活性を抑制することでFIPの病態悪化が抑制されることを示した。即ち、抗fTNF-alpha mouse mAbをFIP発症猫に投与することで、FIP発症猫の生存期間およびquality of lifeを改善することを報告した。しかしながら、mouse mAbを異種の動物に繰り返し投与した場合、副作用が生じる可能性が考えられる。そこで著者は第5章において、抗fTNF-alpha mouse mAbを改変したmouse-feline chimeric mAb(chimeric mAb 2-4)を作製するとともに、fTNF-alphaに対する中和活性を調べた。また、精製したmouse mAb 2-4およびchimeric mAb 2-4を猫に反復投与することで、feline anti-mouse antibody responseの誘導能が変化するか否かについても検討した。

抗fTNF-alpha mouse mAb 2-4の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させたchimeric mAb 2-4をFO細胞に発現させた。mouse mAb 2-4とchimeric mAb 2-4を精製後、western blottingによる性状解析を行った。抗mouse IgG抗体はmouse mAb 2-4に反応したが、chimeric mAb 2-4とは反応しなかった。一方、抗feline IgG

抗体は mouse mAb 2-4 に対して反応しなかったが、chimeric mAb 2-4 と反応した。即ち、chimeric mAb 2-4 は猫の IgG に類似した抗原性を持つことが確認された。また、精製した chimeric mAb 2-4 が fTNF-alpha を中和するか否かを確かめたところ、chimeric mAb 2-4 は mouse mAb 2-4 と同様に組換えおよび天然型 fTNF-alpha を中和した。これらの結果から、chimeric mAb 2-4 は mouse mAb 2-4 と同様に fTNF-alpha に対する中和能を保有すると共に feline IgG の特徴を有する chimeric antibody に改変されていると考えられた。

精製した mouse mAb 2-4 と chimeric mAb 2-4 を猫に投与した。これらの抗体を投与した猫では、両群共に 5 回の反復投与において、mAb 投与によるアナフィラキシー反応の惹起は観察されなかった。Umehashi らは mouse mAb および mouse-feline chimeric mAb の反復投与試験とアナフィラキシー反応惹起の関係を報告した [94]。彼らの報告では 10 mg/kg の mouse mAb または chimeric mAb を猫に複数回投与した場合では、いずれもアナフィラキシー反応を惹起しなかった。しかし、50 mg/kg の mouse mAb を投与した猫においてはアナフィラキシー反応が誘導された。これらのことを踏まえると、今回の実験で使用した抗体量および投与回数ではアナフィラキシー反応を起こさない程度の反応であったと推察された。human-mouse chimeric mAb である infliximab は通常 3 または 5 mg/kg の投与量でヒトに反復投与されている [22, 48, 50]。また、mouse mAb 2-4 は 3 mg/kg の投与量で FIP 発症猫に対して治療効果を示した。これらを踏まえて我々は今回の投与量を設定

した。今後、高濃度での反復投与によりアナフィラキシー反応が誘導されるか否かの実験の実施が望まれる。

FIP 発症猫に mouse mAb 2-4 を単回投与することで生存期間および quality of life が改善する。しかし、一回の投与のみでは治療効果が得られない猫も存在した。実際に、anti-fTNF-alpha drug を FIP 発症猫に投与する場合、単回投与のみで治療効果が得られるとは考えにくい。即ち、FIP の治療の際には猫に対して mAb 2-4 を複数回投与する必要がある。しかしながら、mouse mAb を複数回投与した場合には、上述のようにアナフィラキシー反応が惹起される可能性に加え、mouse mAb 2-4 を投与した猫において feline anti-mouse antibody response が誘導されることで、fTNF-alpha に対する反応性が低下し、治療効果が弱まる可能性も考えられる。Chimeric mAb 2-4 も可変部位がマウス由来のタンパク質であり、mouse mAb 2-4 と同様に feline anti-chimeric antibody が産生される可能性は否定できない。そこで、mAb を投与した猫に feline anti-mouse antibody または feline anti-chimeric antibody が誘導されるか否かを調べた。mouse mAb 2-4 を投与した猫の血清中には初回投与後から mouse IgG に対する feline anti-mouse antibody が誘導され、mouse mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和効果が減弱した。一方、1 mg/kg の chimeric mAb 2-4 を投与した猫では feline anti-chimeric antibody の誘導は認められなかった。即ち、mouse mAb 2-4 を chimeric mAb 2-4 に改変することで feline anti-mouse antibody が誘導されにくくなることが推察された。このことを踏まえると、chimeric mAb 2-4 は猫に反復投与しても治療効果が低下すること

はないと考えられた。しかし、5 mg/kg の chimeric mAb 2-4 を投与した猫では 2 回投与以降に feline anti-chimeric antibody の誘導が認められた。即ち、chimeric mAb 2-4 でも、投与量を多くすると feline anti-chimeric antibody が産生されることが強く示唆された。infliximab でも同様に、human anti-chimeric antibody の産生に伴う治療効果の減弱が認められている [21]。しかし、infliximab を投与する際に免疫抑制剤の一つである methotrexate (MTX) を一緒に投与すると human anti-chimeric antibody の産生を抑制することが可能である。MTX には液性免疫応答を抑制する作用があり、これに伴い infliximab 投与後における human anti-chimeric antibody の産生も低下すると考えられている [48, 50]。Chimeric mAb 2-4 の使用においても MTX と併用することで feline anti-chimeric antibody の産生を抑制することが可能かもしれない。今後、cat with FIP に対して chimeric mAb 2-4 を投与する際に MTX との併用が可能か否かを検討する必要がある。

第 5 章において著者は、抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させた mouse-feline chimeric mAb 2-4 を作製し、fTNF- $\alpha$  に対する中和能が維持されていることを確認した。さらに、作製した chimeric mAb 2-4 を猫に投与した場合、猫に対する feline anti-mouse antibody response の誘導能が mouse mAb 2-4 と比較して減弱していることを確かめた。今後は、FIP 発症猫に実際に投与する際の適切な投与量と投与回数の検討を行い、FIP に対する有効な治療薬としての可能性を調べることが望まれる。

## 小活

FIPはFIPVの感染により引き起こされる致死性炎症性疾患であり、その病態悪化にはウイルス感染マクロファージ・単球から産生される fTNF-alpha が深く関わっている。著者は fTNF-alpha に対して高い中和活性を有する抗 fTNF-alpha mAb 2-4 を産生するハイブリドーマを第 3 章にて樹立した。さらに第 3 章および第 4 章にて、この mouse mAb 2-4 は、fTNF-alpha によって誘導される FIP の病態の悪化を改善することを in vitro および in vivo の系で明らかにした。しかし、本抗体はマウス由来の抗体であり猫に対して異種のタンパク質である。即ち、feline anti-mouse antibody が誘導されることで、mouse mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する反応性が低下する可能性が考えられる。そこで著者は第 5 章において、mouse mAb 2-4 の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させた mouse-feline chimeric mAb (chimeric mAb 2-4) を作製した。chimeric mAb 2-4 は mouse mAb 2-4 と同等の fTNF-alpha に対する中和能を持つことが確認された。精製した mouse mAb 2-4 および chimeric mAb 2-4 を猫に反復投与し、feline anti-mouse antibody response の誘導能の変化を調べた。mouse mAb 2-4 を投与した猫の血清中には feline anti-mouse antibody が誘導されるとともに、mouse mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和効果が明らかに減弱した。一方、chimeric mAb 2-4 を投与した猫においては、feline anti-mouse antibody response が mouse mAb 2-4 を投与した猫と比較して減弱していた。以上の結果から、

chimeric mAb 2-4 は mouse mAb 2-4 よりも FIP の治療薬として有用であると考えられた。今後は、FIP 発症猫に実際に投与する際の適切な投与量と投与回数の検討を行い、FIP に対する有効な治療薬としての可能性を調べることが望まれる。



表4 mAb 2-4可変領域および猫イムノグロブリン定常領域のプライマーの塩基配列

	Orientation	Sequence
HV	Forward	5'-AAGCTTGCCGCCACCATGGCCTGGCTGTGGA ACTT-3'
	Reverse	5'-GGATCCACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGT-3'
LV	Forward	5'-AAGCTTGCCGCCACCATGGCCCCGTCTATTCAGTT-3'
	Reverse	5'-GGATCCACTTATTGATTTCCAGCTT-3'
CH	Forward	5'-GGTGAGTGGATCCAGACCACGGCCCCATCG-3'
	Reverse	5'-TGCTCATTACCCGGAGA-3'
CL	Forward	5'-AAGTGGATCCAGAGTGATGCTCAGCCATCT-3'
	Reverse	5'-CTACTCTCTCTGACACTCGCTCCT-3'

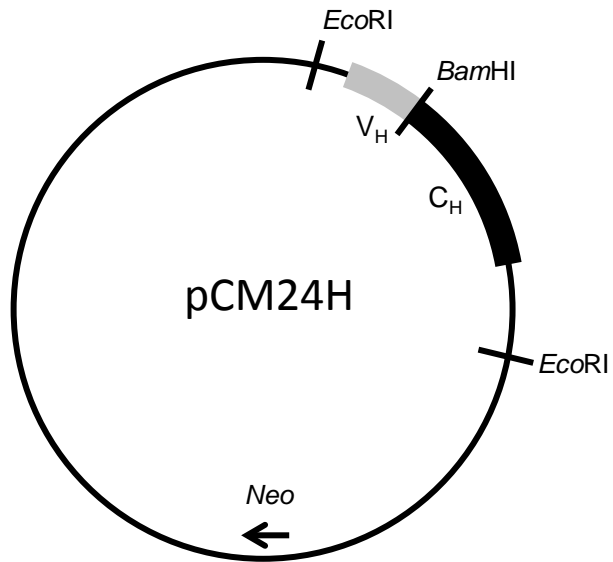
表5 mAb投与猫の血圧、体温および心拍数

Dose of mAbs (mg/ml)	Parameter		First	Second	Third	Fourth	Fifth	
			injection (Day 0)	injection (Day 14)	injection (Day 28)	injection (Day 42)	injection (Day 72)	
PBS (control)	0	Blood pressures (systolic blood pressure/diastolic blood pressure, mmHg)	Pre injection 1)	182.0/162.7	162.3/129.7	169.3/140.7	179.7/152.0	163.7/140.0
			Post injection 2)	164.0/146.3	156.0/142.0	156.3/139.0	158.3/131.7	209.7/139.7
	Body temperature (°C)	Pre injection 1)	39.2	38.6	38.9	38.8	39.0	
		Post injection 2)	38.2	38.0	38.0	38.3	37.4	
	Heart rate (BPM)	Pre injection 1)	138.0	130.0	151.0	115.3	121.0	
		Post injection 2)	136.3	140.7	140.7	113.7	114.7	
Mouse mAb 2-4	1	Blood pressures (systolic blood pressure/diastolic blood pressure, mmHg)	Pre injection 1)	192.3/162.7	156.0/130.7	151.3/117.0	179.0/165.0	169.3/113.0
			Post injection 2)	156.0/126.7	168.0/116.7	143.0/121.0	208.7/168.7	156.7/114.0
		Body temperature (°C)	Pre injection 1)	39.3	38.7	38.2	38.8	39.0
			Post injection 2)	38.0	36.9	36.1	37.5	38.9
		Heart rate (BPM)	Pre injection 1)	128.7	135.3	125.0	114.0	136.3
			Post injection 2)	129.0	115.7	127.0	114.3	128.0
	5	Blood pressures (systolic blood pressure/diastolic blood pressure, mmHg)	Pre injection 1)	160.7/134.0	161.3/116.3	159.7/135.0	189.7/156.0	153.3/95.0
			Post injection 2)	148.7/128.7	170.7/152.0	145.3/93.3	126.3/98.3	165.0/93.3
		Body temperature (°C)	Pre injection 1)	38.6	37.7	37.3	38.6	38.8
			Post injection 2)	38.0	37.7	36.9	38.3	38.2
		Heart rate (BPM)	Pre injection 1)	141.0	142.0	127.0	146.0	145.0
			Post injection 2)	144.7	131.3	131.7	140.7	138.7
Chimeric mAb 2-4	1	Blood pressures (systolic blood pressure/diastolic blood pressure, mmHg)	Pre injection 1)	160.7/132.3	186.7/161.7	196.7/146.0	188.0/157.3	168.7/136.0
			Post injection 2)	161.3/113.0	149.3/128.3	140.7/120.3	161.7/127.3	142.7/120.3
		Body temperature (°C)	Pre injection 1)	38.6	38.9	38.3	38.5	38.6
			Post injection 2)	37.5	37.9	36.8	37.9	37.9
		Heart rate (BPM)	Pre injection 1)	105.0	141.3	141.7	108.0	115.0
			Post injection 2)	86.7	138.0	132.0	120.3	113.0
	5	Blood pressures (systolic blood pressure/diastolic blood pressure, mmHg)	Pre injection 1)	172.7/136.0	175.0/138.7	164.7/140.3	160.7/152.0	178.3/140.3
			Post injection 2)	149.3/103.3	163.3/143.3	149.0/113.3	175.3/147.0	148.3/99.3
		Body temperature (°C)	Pre injection 1)	39.8	38.7	39.1	39.4	39.2
			Post injection 2)	38.1	38.4	38.2	38.2	38.7
		Heart rate (BPM)	Pre injection 1)	146.3	153.0	139.0	116.3	131.3
			Post injection 2)	145.0	148.0	134.7	115.7	135.7

1) PBSまたはmAbを投与する直前

2) PBSまたはmAbを投与した10分後

A



B

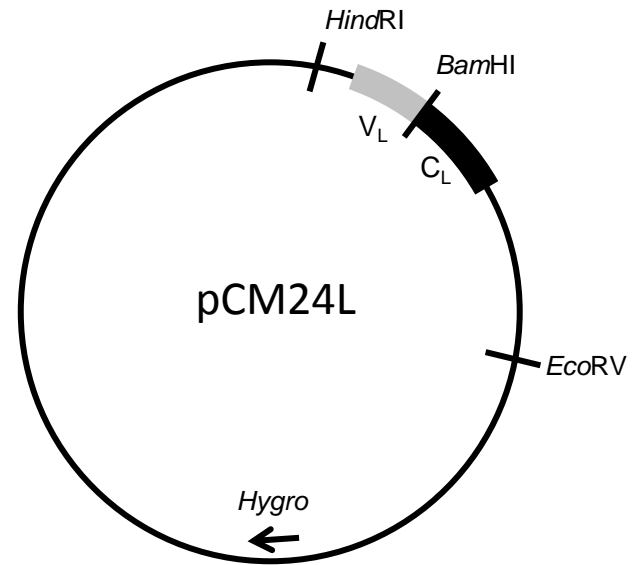


図21 chimeric mAb 2-4発現ベクターのplasmid map

(A) 重鎖 (B) 軽鎖

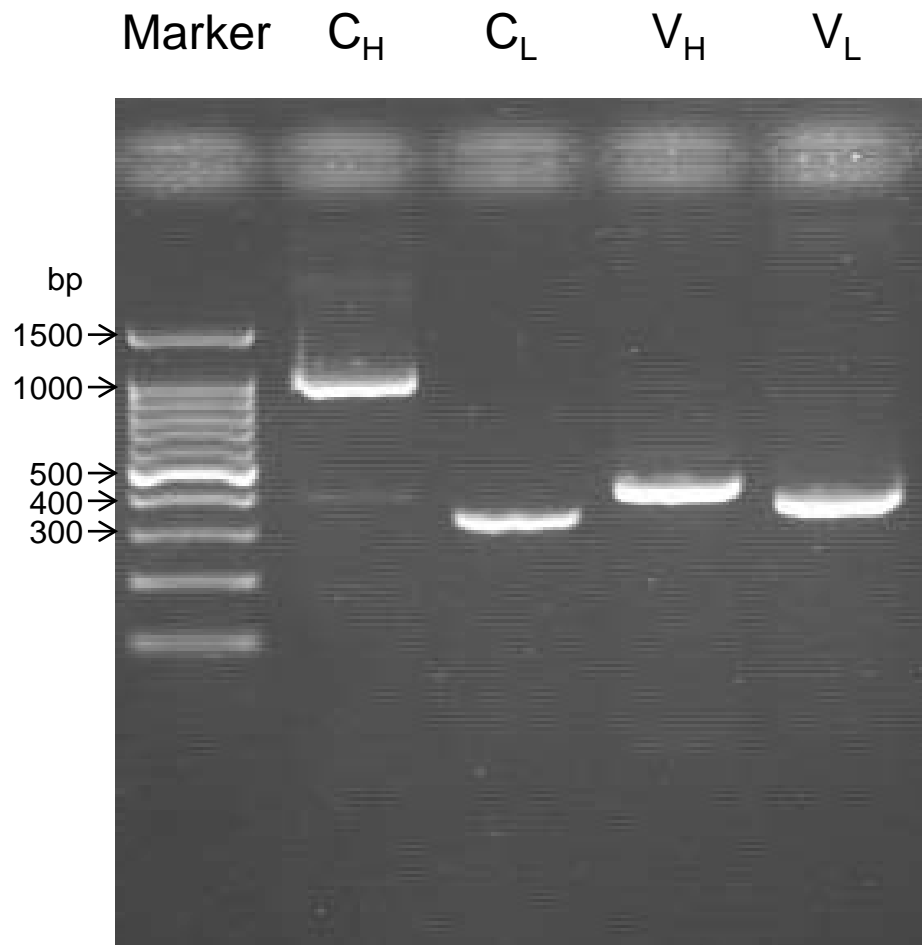


図22 CH、CL、VHおよびVL fragments

各遺伝子のPCR産物を1.5% agarose gelで電気泳動した。

```

|-Leader=====|-FR1-----
1  M A P S I Q F L G L L L F W L H G A Q C D I Q M T Q S P S S L S A S L G G K V T 40
1  ATG GCC CCG TCT ATT CAG TTC CTG GGG CTC TTG TTG TTC TGG CTT CAT GGT GCT CAG TGT GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCG TCC TCA CTG TCT GCG TCT CTG GGA GGC AAA GTC ACC 120

-FR1-----|_CDR1-----|-FR2-----|_CDR2-----|-FR3-----
41  I T C K A S Q D I N N Y V A W Y Q H K P G K G P W L L I H Y T S T L Q P G I P S 80
121 ATC ACT TGC AAG GCA AGC CAG GAC ATT AAC AAC TAT GTA GCT TGG TAC CAA CAC AAG CCT GGA AAA GGT CCT TGG CTG CTC ATA CAT TAC ACA TCT ACA TTA CAG CCA GGC ATC CCA TCA 240

-FR3-----|_CDR3-----|-FR4-----
81  R F S G S G S G R D Y S F S I S N L E P E D V A T Y Y C L Q Y D N L L S F G G G 120
241 AGG TTC AGT GGA AGT GGG TCT GGG AGA GAT TAT TCC TTC AGC ATC AGT AAC CTG GAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAT TGT CTA CAG TAT GAT AAT CTT CTG TCG TTC GGT GGA GGC 360

-FR4-----|_linker-----|-fIg L chain constant-----
121 T K L E I N K W I Q S D A Q P S V F L F Q P S L D E L H T G S A S I V C I L N D 160
361 ACC AAG CTG GAA ATC AAT AAG TGG ATC CAG AGT GAT GCT CAG CCA TCT GTC TTT CTC TTC CAA CCA TCT CTG GAC GAG TTA CAT ACA GGA AGT GCC TCT ATC GTG TGC ATA TTG AAT GAC 480

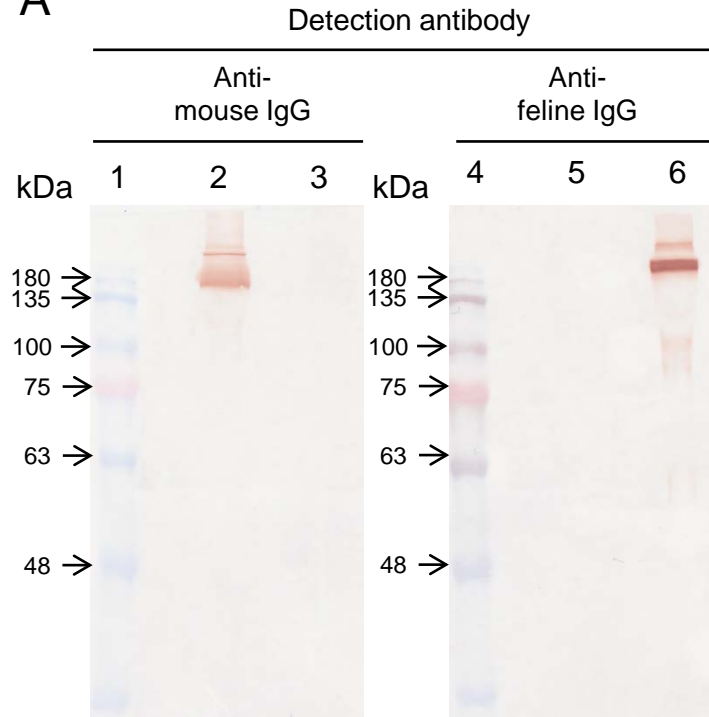
-fIg L chain constant-----
161 F Y P K E V N V K W K V D G V V Q N K G I Q E S T T E Q N S K D S T Y S L S S T 200
481 TTC TAC CCC AAA GAG GTC AAT GTC AAG TGG AAA GTG GAT GGC GTA GTC CAA AAC AAA GGC ATC CAG GAG AGC ACC ACA GAG CAG AAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC 600

-fIg L chain constant-----|
201 L T M S S T E Y Q S H E K F S C E V T H K S L A S T L V K S F N R S E C Q R E * 240
601 CTG ACG ATG TCC AGT ACG GAG TAC CAA AGT CAT GAA AAG TTC TCC TGC GAG GTC ACT CAC AAG AGC CTG GCC TCC ACC CTC GTC AAG AGC TTC AAC AGG AGC GAG TGT CAG AGA GAG TAG 720

```

図24 chimeric mAb 2-4軽鎖の推定塩基配列および推定アミノ酸配列

A



B

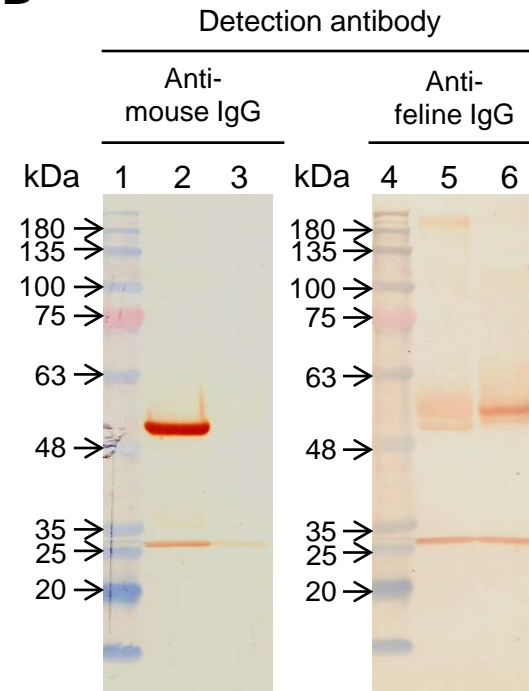


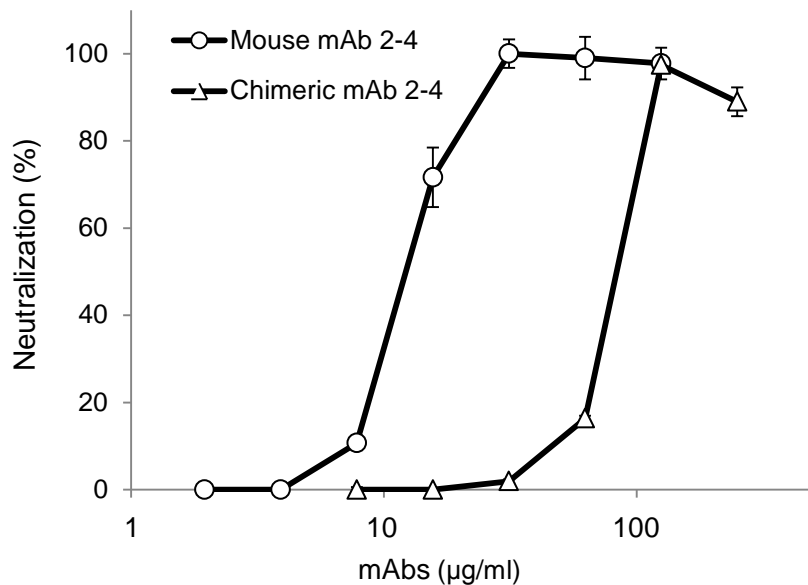
図25 精製mouse mAb 2-4およびchimeric mAb 2-4のwestern blot analysis

mouse mAb 2-4およびchimeric mAb 2-4をreducingまたはnon-reducing conditions において12.5% polyacrylamide gelで電気泳動した。mouse mAb 2-4およびchimeric mAb 2-4を抗mouse IgG抗体または抗feline IgG抗体を用いて検出した。

Lane 1および4; marker、Lane 2および5; mouse mAb 2-4、Lane 3および6; chimeric mAb 2-4。

(A) Non-reducing condition. (B) Reducing condition.

A



B

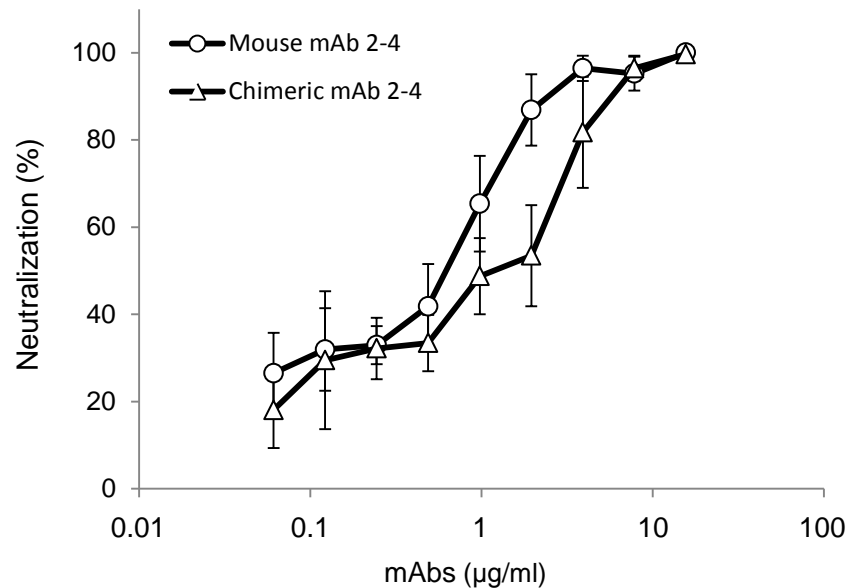
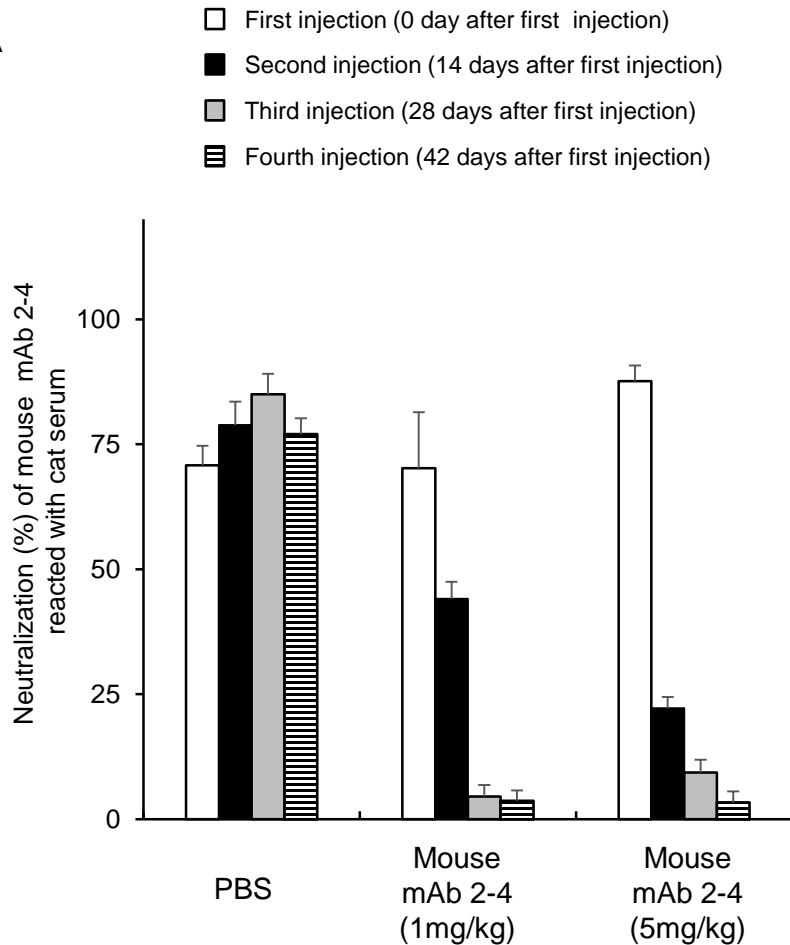


図26 mouse mAb 2-4およびchimeric mAb 2-4のfTNF-alphaに対する中和活性

階段希釈した精製抗fTNF-alpha mAbとfTNF-alphaを等量混合し37°Cで60分間反応させた。反応させた検体とWEHI-164細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml)を各50  $\mu$ l/wellずつ96穴プレートに加え混和し、37°Cで24時間培養した。培養後、WST-8を10  $\mu$ l/well加え、37°C、60分間呈色反応を行った。

(A)組換えfTNF-alpha (10 ng/ml) (B) 天然型fTNF-alpha (FIP発症猫腹水)

A



B

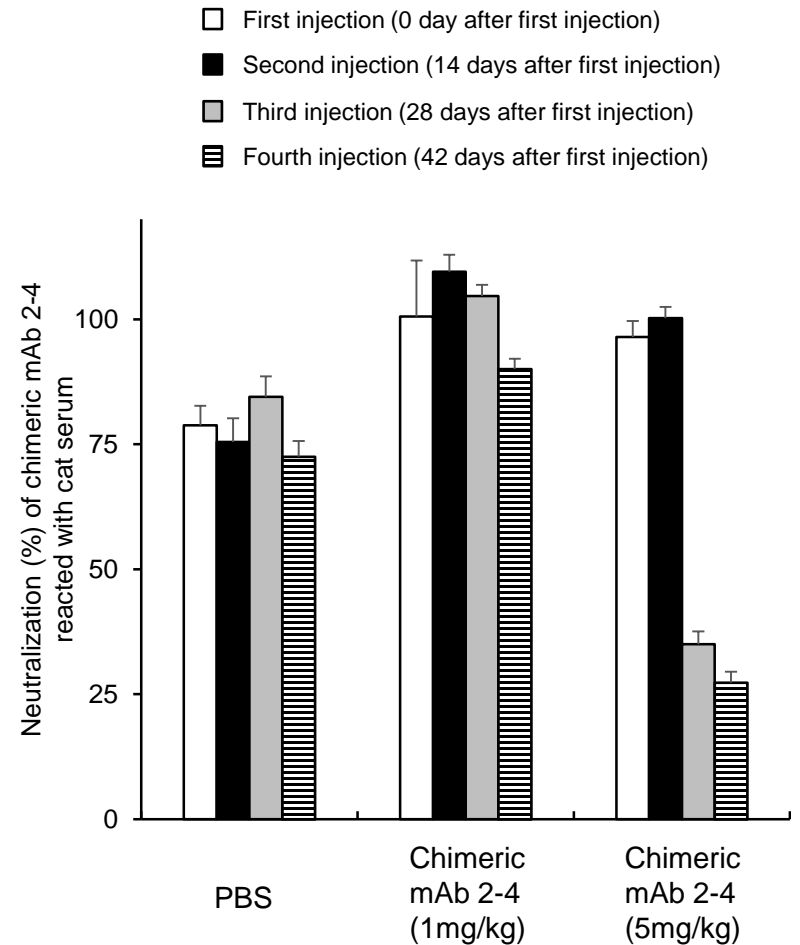


図27 mouse mAb 2-4またはchimeric mAb 2-4を投与した猫の血清と反応させたmouse mAb 2-4またはchimeric mAb 2-4の中和活性の変化

mAb投与猫血清とmouse mAb 2-4またはchimeric mAb 2-4を1時間反応させた。その後、各反応物に組換えfTNF-alpha (最終濃度10 ng/ml)を加えた。さらに1時間後、反応物をWEHI-164細胞に接種した。24時間後におけるfTNF-alphaのWEHI-164細胞に対する細胞傷害率を測定し、mouse mAb 2-4およびchimeric mAb 2-4のfTNF-alphaに対する中和活性を算出した。(A) PBSまたはmouse mAb 2-4を投与した猫の血清と反応させたmouse mAb 2-4の組換えfTNF-alphaに対する中和活性 (B) PBSまたはchimeric mAb 2-4を投与した猫の血清と反応させたchimeric mAb 2-4の組換えfTNF-alphaに対する中和活性



## 第 6 章

### 総括

## 総括

FIPはFIPVの感染により引き起こされる致死性のウイルス感染症である。過去40年に渡って、FIPを治療するために国内外で様々な研究が行われてきたが、いまだにFIPに対する有効な治療方法は確立していない。著者は、FIPVの感染様式およびFIPの病態を踏まえて、FIPの治療薬の開発を試みた。

近年、ウイルス蛋白質のアミノ酸配列を基にした peptide が抗ウイルス薬として注目されている。それらの peptide はウイルス構成蛋白質または細胞のウイルスレセプターと結合し、ウイルスの感染を阻害する。FIPVでもこのような peptide が抗FIPV効果を示す可能性が考えられる。そこで著者は第2章において野外で流行の多いI型FIPVであるKU-2株のS蛋白質S1領域のアミノ酸配列を参考に、30種の overlapping peptide を合成し、それらのFIPVに対する感染抑制効果を調べた。peptideのI型FIPVに対する感染抑制効果を評価するに当たり、まず、株化細胞において増殖性が乏しいI型FIPVの感染効率を増加させる方法を検討した。その結果、ポリカチオンを含む medium でウイルスを希釈することでI型FIPVの感染効率がおよそ4倍に上昇することが明らかとなった。そこで以後の実験では、ポリカチオンを添加した medium を用いて実施した。30種の peptide のうち、I-S1-8、I-S1-9、I-S1-10、I-S1-16 および I-S1-22 が I 型 FIPV KU-2 株の感染を有意に減少させた。これらの peptide のうち、特に高い感染抑制効果を示した I-S1-9 および I-S1-16 を用いて他の I 型

および II 型 FIPV 株、猫ヘルペスウイルス (FHV)、および猫カリシウイルス (FCV) に対する感染抑制効果を調べた。これら peptide は I 型および II 型 FIPV の感染を特異的に抑制したが、FHV および FCV の感染は抑制しなかった。I-S1-9 および I-S1-16 の抗ウイルス活性は、細胞に peptide を反応後、洗浄することにより減少した。特に I-S1-9 は FIPV の細胞への結合を競合的に阻害し、FIPV の感染効率を低下させる可能性が推察された。

近年、FIP の病態悪化にはウイルス感染マクロファージから産生される fTNF-alpha が深く関わっていることが報告されている。TNF-alpha は免疫の誘導に重要なサイトカインであるが、過剰に産生された場合、炎症性の免疫疾患を引き起こす。ヒト医学領域ではこのような疾患に対して TNF-alpha を中和する抗体が治療薬として用いられている。このことを踏まえ、fTNF-alpha を中和する抗体を FIP 発症猫に投与すれば、その症状を緩和できる可能性が考えられる。そこで著者は第 3 章において fTNF-alpha を認識する 9 種類のモノクローナル抗体 (mAb) を作出するとともに、すべての mAb の組換え fTNF-alpha に対する中和活性および IC50 (組換え fTNF-alpha の細胞傷害活性を 50% 抑制する mAb の濃度) を WEHI-164 細胞に対する細胞傷害試験を用いて測定した。全ての mAb が組換え fTNF-alpha を中和した。IC50 と組換え fTNF-alpha に対する反応性の違いに基づいて 3 種類の mAb を選抜し、FIPV 感染マクロファージ由来の天然型 fTNF-alpha に対する中和活性を測定した。その結果、mAb 2-4 が組換えおよび天然型 fTNF-alpha の両方に対して高い中和活性を有していた。さらに mAb 2-4 の FIP 治療薬としての有効性を確認するため fTNF-alpha が関与する FIP

の病態悪化を mAb 2-4 が抑制できるか否かを *in vitro* の系で検討した。その結果、mAb 2-4 は FIP 発症猫由来好中球の生存率の増加を抑制するとともに、FIP 発症猫で認められる T リンパ球のアポトーシスによる減少を抑制することを確認した。即ち、mAb 2-4 は fTNF- $\alpha$  の生理活性を中和することで FIP の病態悪化を抑制する可能性が示唆された。

第 4 章では、fTNF- $\alpha$  を効率的に中和する mAb 2-4 を FIP 発症猫に投与して FIP の症状の緩和および生存率の改善が認められるか否かを調べた。mAb 2-4 を投与した猫では 3 頭中 2 頭において症状の改善が認められるとともに、実験終了時まで FIP 発症は認められなかった。一方、対照群の猫では、3 頭全てが FIP を発症した。mAb 2-4 を投与した猫では、抗体投与後に血漿中の  $\alpha$ 1-酸性糖蛋白質および血管増殖因子濃度の改善が認められるとともに、末梢血リンパ球数の回復も認められた。即ち、抗 fTNF- $\alpha$  mAb 2-4 が FIP の治療に有効であることが強く示唆された。

第 4 章の結果から、mAb 2-4 は FIP の治療薬として有用となる可能性が強く示唆された。しかし、本抗体はマウス由来の抗体であり猫に対して異種の蛋白質である。即ち、feline anti-mouse antibody が誘導されることで、mouse mAb 2-4 の fTNF- $\alpha$  に対する反応性が低下する可能性が考えられた。そこで著者は第 5 章において、mouse mAb 2-4 の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させた mouse-feline chimeric mAb (chimeric mAb 2-4) の作製を試みた。著者が作製した chimeric mAb 2-4 は、抗猫 IgG 抗体と反応し、fTNF- $\alpha$  に対する中和活性も mouse mAb 2-4 と同等

であることが確認された。そこで、精製した chimeric mAb 2-4 および mouse mAb 2-4 を猫に反復投与し、feline anti-mouse antibody response の誘導能の変化を調べた。mouse mAb 2-4 を投与した猫の血清中には feline anti-mouse antibody が誘導されるとともに、mouse mAb 2-4 の fTNF-alpha に対する中和効果が明らかに減弱した。一方、chimeric mAb 2-4 を投与した猫においては、feline anti-mouse antibody response が mouse mAb 2-4 を投与した猫と比較して減弱していた。以上の結果から、chimeric mAb 2-4 は mouse mAb 2-4 よりも FIP の治療薬として有用であることが示唆された。

著者は本論文において抗 FIPV 活性を有する peptide を同定するとともに、抗 fTNF-alpha mAb 2-4 が FIP の治療に有効であることを *in vitro* および *in vivo* で示した。抗 TNF-alpha mAb は抗ウイルス薬と併用することでウイルス感染症に対する治療効果が上昇することが報告されている。したがって、mAb 2-4 を単独で治療薬として用いるのではなく、本論文で同定した peptide やこれまでの研究で報告された抗 FIPV 薬と併用することで FIP に対する治療効果をさらに高めることができると考えられる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇切なるご指導と御校閲を賜りました本学獣医学部獣医伝染病学研究室 宝達勉教授、高野友美講師に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、多大なるご協力を賜りました獣医伝染病学研究室の皆様、北里研究所生物製剤研究所様、および Meiji Seika ファルマ株式会社様に衷心より謝意を表します。

## 参考文献

1. Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, AD., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2009. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. J. Feline. Med. Surg. 11: 594-604.
2. Addie, DD., and Ishida, T., 2008. Feline Infectious Peritonitis: Therapy and Prevention. In: Bonagura, J.D., Twedt, D.C. (Eds.), Kirk's Current Veterinary Therapy XIV Saunders Elsevier. pp.1295-1299.
3. Addie, D.D., Schaap, I.A., Nicolson, L., Jarrett, O., 2003. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. J. Gen. Virol. 84: 2735-2744.
4. Alvarez, H.M., So, O.Y., Hsieh, S., Shinsky-Bjorde, N., Ma, H., Song, Y., Pang, Y., Marian, M., Escandón, E., 2012. Effects of PEGylation and immune complex formation on the pharmacokinetics and biodistribution of recombinant interleukin 10 in mice. Drug Metab. Dispos. 40: 360-373.
5. Andersen, J.T., Pehrson, R., Tolmachev, V., Daba, M.B., Abrahmsén, L., Ekblad, C., 2011. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain. J. Biol. Chem. 286:

5234-5241.

6. Bailey, C.A., Miller, D.K., Lenard, J., 1984. Effects of DEAE-dextran on infection and hemolysis by VSV. Evidence that nonspecific electrostatic interactions mediate effective binding of VSV to cells. Virology 133: 111-118.
7. Balzarini, J., Keyaerts, E., Vijgen, L., Vandermeer, F., Stevens, M., De, Clercq, E., Egberink, H., Van, Ranst, M., 2006. Pyridine N-oxide derivatives are inhibitory to the human SARS and feline infectious peritonitis coronavirus in cell culture. J. Antimicrob. Chemother. 57: 472-481.
8. Bank-Wolf, B.R., Stallkamp, I., Wiese, S., Moritz, A., Tekes, G., Thiel, H.J., 2014 Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. Veterinary Microbiology 173: 177-188.
9. Barlough, J.E., Shacklett, B.L. 1994. Antiviral studies of feline infectious peritonitis virus in vitro. Vet. Rec. 135: 177-179.
10. Boivin, N., Menasria, R., Piret, J., Rivest, S., Boivin, G., 2013. The Combination of Valacyclovir with an Anti-TNF Alpha Antibody Increases Survival Rate Compared to Antiviral Therapy Alone in a Murine Model of Herpes Simplex Virus Encephalitis. Antiviral Research 100: 649-653.
11. Bosch, B.J., van, der, Zee, R., de, Haan, C.A., Rottier, P.J., 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus



- fusion protein, structural and functional characterization of the fusion core complex. J. Virol. 77: 8801-8811.
12. Breslin, J.J., Mørk, I., Smith, M.K., Vogel, L.K., Hemmila, E.M., Bonavia, A. Talbot PJ., Sjöström H., Norén O., Holmes KV., 2003. Human Coronavirus 229E: Receptor Binding Domain and Neutralization by Soluble Receptor at 37° C. J. Virol. 77: 4435-4438
13. Brotas, A.M., Cunha, J.M., Lago, E.H., Machado, C.C., Carneiro, S.C., 2012. Tumor necrosis factor-alpha and the cytokine network in psoriasis. Anais Brasileiros de Dermatologia 87: 673-681.
14. Corapi, W.V., Olsen, C.W., Scott, F.W. 1992. Monoclonal antibody analysis of neutralization and antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus. J. Virol. 66: 6695-6705.
15. Corapi, W.V., Darteil, R.J., Audonnet, J.C., Chappuis, G.E. 1995. Localization of antigenic sites of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus involved in neutralization and antibody-dependent enhancement. J. Virol. 69: 2858-2862.
16. de, Groot-Mijnes, J.D., van, Dun, J.M., van, der, Most, R.G., de, Groot, R.J. 2005. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. Journal of Virology 79:

1036-1044.

17. Duthie, S., Eckersall, P.D., Addie, D.D., Lawrence, C.E., Jarrett, O. 1997. Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. The Veterinary record 141: 299-303.
18. Dye, C., and Siddell, S.G. 2005. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1164. J. Gen Virol. 86: 2249-2253.
19. Fauci, A.S. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease, implications for therapy. Science 262: 1011-1018.
20. Hainsworth, J.D. 2000, Monoclonal antibody therapy in lymphoid malignancies. Oncologist 5: 376-384
21. Hanauer, S.B. 1999. Review article: safety of infliximab in clinical trials. Aliment Pharmacol. Ther. 4: 16-22.
22. Hanauer, S.B., Feagen, B.G., Lichtenstein, G.R., Mayer, L.F., Schreiber, S., Colombel J.F., Rachmilewitz, D., Rachmilewitz, D., Wolf, D.C., Olson, A., Bao, W., Rutgeerts, P. 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. Lancet 359: 1541-1549.
23. Hartmann, K., and Ritz, S. 2008. Treatment of cats with feline infectious peritonitis. Veterinary Immunology and Immunopathology 123: 172-175.
24. He, Y., 2013. Synthesized peptide inhibitors of HIV-1

- gp41-dependent membrane fusion. Curr. Pharm. Des. 19: 1800-1809.
25. Hirano, N., Suda, W., Ono, K., Murakami, T., Matumoto, M. 1978. Effect of diethylaminoethyl-dextran on plaque formation of mouse hepatitis virus. Jpn. J. Exp. Med. 48: 265-267.
26. Hohdatsu, T., Izumiya, Y., Yokoyama, Y., Kida, K., Koyama, H. 1998. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. Arch. Virol. 143: 839-850.
27. Hohdatsu, T., Nakamura, M., Ishizuka, Y., Yamada, H., Koyama, H. 1991. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. Arch. Virol. 120: 207-217.
28. Hohdatsu, T., Okada, S., Ishizuka, Y., Yamada, H., Koyama, H. 1992. The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. J. Vet. Med. Sci. 54: 557-562.
29. Hohdatsu, T., Okada, S., Koyama, H. 1991. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. Arch. Virol. 117: 85-95.
30. Hohdatsu, T., Sasamoto, T., Okada, S., Koyama, H. 1991.

Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs., preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. Vet. Microbiol. 28: 13-24.

31. Hohdatsu, T., Tatekawa, T., Koyama, H. 1995. Enhancement of feline infectious peritonitis virus type I infection in cell cultures using low-speed centrifugation. J. Virol. Methods 51: 357-362.
32. Hohdatsu, T., Yamada, H., Ishizuka, Y., Koyama, H. 1993. Enhancement and neutralization of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by neutralizing monoclonal antibodies recognizing different epitopes. Microbiol. Immunol. 37: 499-504.
33. Hohdatsu, T., Yamada, M., Tominaga, R., Makino, K., Kida, K., Koyama, H. 1998. Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. J. Vet. Med. Sci. 60: 49-55.
34. 宝達 勉. 2005. 猫のコロナウイルス感染症. In: 望月雅美 (監修), 犬, 猫および愛玩小動物のウイルス病. 学窓社. pp. 175-188.
35. Holzworth, J. 1963. Some important disorders of cats. Cornell Vet. 53: 157-60.
36. Hsieh, L.E., Lin, C.N., Su, B.L., Jan, T.R., Chen, C.M.,

- Wang, C.H., Lin, D.S., Lin, C.T., Chueh, L.L. 2010. Synergistic antiviral effect of Galanthus nivalis agglutinin and nelfinavir against feline coronavirus. Antiviral Research 88: 25-30.
37. Ishida, T., Shibantai, A., Tanaka, S., Uchida, K., Mochizuki, M. 2004. Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. J. Feline Med. Surg. 2: 107-109.
38. Kida, K., Hohdatsu, T., Fujii, K., Koyama, H. 1999. Selection of antigenic variants of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus and analysis of antigenic sites involved in neutralization. J. Vet. Med. Sci. 61: 935-938.
39. Kim, Y., Mandadapu, S.R., Groutas, W.C., Chang, K.O. 2012. Potent inhibition of feline coronaviruses with peptidyl compounds targeting coronavirus 3C-like protease. Antiviral Res. 97: 161-168.
40. Koga, L., Kobayashi, Y., Yazawa, M., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. 2002. Nucleotide sequence and expression of the feline vascular endothelial growth factor. The Journal of Veterinary Medicine Science 64: 453-456.
41. Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G., Kontoyiannis, D., 1999. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid

- arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. Annals of the Rheumatic Diseases 58(Suppl 1): I32-I39.
42. Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
43. Kummrow, M., Meli, M.L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N.C., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H. 2005. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 1209-1215.
44. Li, C., Ge, L.L., Yu, Y.L., Huang, L., Wang, Y., Sun, M.X., Ishag, H., Ma, L.X., Li, X.H., Shen, Z.Q., Mao, X. 2014. A tripeptide (NSK) inhibits Japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo. Arch. Virol. 159: 1045-1055
45. Li, C., Zhang, L.Y., Sun, M.X., Li, P.P., Huang, L., Wei, J.C., Yao, Y.L., Isahg, H., Chen, P.Y., Mao, X. 2012. Inhibition of Japanese encephalitis virus entry into the cells by the envelope glycoprotein domain III (EDIII) and the loop3 peptide derived from EDIII. Antiviral. Res. 94: 179-183.
46. Liao, Y., Yuan, Q., Torres, J., Tam, J.P., Liu, D.X. 2006. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity

- of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. Virology 349: 264-275
47. Licitra, B.N., Millet, J.K., Regan, A.D., Hamilton, B.S., Rinaldi, V.D., Duhamel, G.E., Whittaker, G.R., 2013. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. Emerging Infectious Diseases 19: 1066-1073.
48. Lipsky, P.E., van, der, Heijde, D.M., St, Clair, E.W., Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G.R., Maini, R.N. 2000. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. N. Engl. J. Med. 343: 1594-1602.
49. Liu, I.J., Tsai, W.T., Hsieh, L.E., Chueh, L.L., 2013. Peptides corresponding to the predicted heptad repeat 2 domain of the feline coronavirus spike protein are potent inhibitors of viral infection. PLoS One 8: e82081.
50. Maini, R., St, Clair, E.W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M., Lipsky, P. 1999. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. Lancet 354: 1932-1939.

51. Marastoni, M., Salvadori, S., Scaranari, V., Spisani, S., Reali, E., Traniello, S., Tomatis, A., 1994. Synthesis and activity of new linear and cyclic peptide T derivatives. Arzneimittelforschung 44: 1073-1076.
52. Maury, C.P., and Lähdevirta, J., 1990. Correlation of serum cytokine levels with haematological abnormalities in human immunodeficiency virus infection. Journal of Internal Medicine 227: 253-257.
53. Mitsuya, H., Yarchoan, R., Kageyama, S., Broder, S., 1991. Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. FASEB journal 5: 2369-2381.
54. Moss, M.L., Jin, S.L., Becherer, J.D., Bickett, D.M., Burkhart, W., Chen, W.J., Hassler, D., Leesnitzer, M.T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., Willard, D., 1997. Structural features and biochemical properties of TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). Journal of Neuroimmunology 72: 127-129.
55. Motokawa, K., Hohdatsu, T., Aizawa, C., Koyama H., Hashimoto, H. 1995. Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. Arch. Virol. 140: 469-480.
56. Motokawa, K., Hohdatsu, T., Hashimoto, H., Koyama, H., 1996. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane



- and nucleocapsid proteins of feline., canine and porcine coronaviruses. Microbiol. Immunol. 40: 425-433.
57. Nguyen, T.D., Bottreau, E., Aynaud, J.M. 1987. Transmissible gastroenteritis (TGE. of swine, in vitro virus attachment and effects of polyanions and polycations. Vet. Microbiol. 14: 343-354.
58. Østergaard, H., Bjelke, J.R., Hansen, L., Petersen, L.C., Pedersen, A.A., Elm, T., Møller, F., Hermit, M.B., Holm, P.K., Krogh, T.N., Petersen, J.M., Ezban, M., Sørensen, B.B., Andersen, M.D., Agersø, H., Ahmadian, H., Balling, K.W., Christiansen, M.L., Knobe, K., Nichols, T.C., Bjørn, S.E., Tranholm, M., 2011. Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. Blood 118: 2333-2341.
59. Olsen, C.W. 1993. A review of feline infectious peritonitis virus, molecular biology., immunopathogenesis., clinical aspects., and vaccination. Vet. Microbiol. 36: 1-37.
60. Olsen, C.W., Corapi, W.V., Ngichabe, C.K., Baines, J.D., Scott, F.W., 1992. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages. J. Virol. 66: 956-965.
61. Paltrinieri, S., Giordano, A., Tranquillo, V.,

- Guazzetti, S., 2007. Critical assessment of the diagnostic value of feline alpha1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 19: 266-272.
62. Paltrinieri, S., Metzger, C., Battilani, M., Pocacqua, V., Gelain, M.E., Giordano, A. 2007. Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. Journal of Feline Medicine and Surgery. 9: 271-277.
63. Pedersen, N.C. 2009. A review of feline infectious peritonitis virus infection, 1963-2008. J. Feline. Med. Surg. 11: 225-258.
64. Pedersen, N.C., Black, J.W., Boyle, J.F., Evermann, J.F., McKeirnan, A.J., Ott, R.L. 1984. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. Adv. Exp. Med. Biol. 173: 365-380.
65. Pedersen, N.C., and Boyle, J.F. 1980. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. Am. J. Vet. Res. 41: 868-876.
66. Pedersen, N.C., Boyle, J.F., Floyd, K., Fudge, A., Barker, J., 1981. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. Am. J. Vet. Res. 42: 368-377.
67. Pedersen, N.C. and Floyd, K. 1985. Experimental studies

- with three new strains of feline infectious peritonitis virus FIPV-UCD2, FIPV-UCD3, and FIPV-UCD4. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 7: 1001-1011.
68. Pedersen, N.C., Liu, H., Scarlett, J., Leutenegger, C.M., Golovko, L., Kennedy, H., Kamal, F.M., 2012. Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. Virus Research 165: 17-28.
69. Porter, E., Tasker, S., Day, M.J., Harley, R., Kipar, A., Siddell, S.G., Helps, C.R., 2014. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. Veterinary Research 45:49.
70. Poli, G., Kinter, A., Justement, J.S., Kehrl, J.H., Bressler, P., Stanley, S., Fauci, A.S., 1990. Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 782-785.
71. Regan, A.D, Cohen, R.D, Whittaker, G.R. 2009. Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. Virology. 384: 135-143.

72. Regan, A.D., Millet, J.K., Tse, L.P., Chillag, Z., Rinaldi, V.D., Licitra, B.N., Dubovi, E.J., Town, C.D., Whittaker, G.R. 2012. Characterization of a recombinant canine coronavirus with a distinct receptor-binding (S1) domain. Virology 430: 90-99.
73. Regan, A.D., and Whittaker, G.R., 2008. Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells. J. Virol. 82: 11992-11996.
74. Reguera, J., Santiago, C., Mudgal, G., Ordoño, D., Enjuanes, L., Casasnovas, J.M., 2012. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. PLoS Pathog. 8, e1002859.
75. Reinhard, C., Shmoon, B., Shyamala, V., Williams, L.T., 1997. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. EMBO Journal 16: 1080-1092.
76. Ritz, S., Egberink, H., Hartmann, K. 2007. Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. Journal of Veterinary Internal Medicine 21: 1193-1197.
77. R&D Systems Product data sheet  
[<http://www.rndsystems.com/pdf/2586-FT.pdf>]
78. Saijo, S., Watanabe, N., Kobayashi, Y. 1995. Comparison of reactivity of monoclonal antibody (3F2) to trimeric

- tumor necrosis factor (TNF-alpha) with that to monomeric TNF-alpha. J. Biochem. 118: 28-32.
79. Shechter, Y., Tsubery, H., Mironchik, M., Rubinstein, M., Fridkin, M. 2005. Reversible PEGylation of peptide YY3-36 prolongs its inhibition of food intake in mice. FEBS Lett. 579: 2439-2444.
80. Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M., Iwata, H. 2007. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. Vet. Microbiol. 124: 348-352.
81. Smith, R.A., Baglioni, C., 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. Journal of Biological Chemistry 262: 6951-6954.
82. Sockolosky, J.T., Kivimäe, S., Szoka, F.C. 2014. Fusion of a short peptide that binds immunoglobulin G to a recombinant protein substantially increases its plasma half-life in mice. PLoS One 9, e102566.
83. Song, M.Y., Park, S.K., Kim, C.S., Yoo, T.H., Kim, B., Kim, M.S., Kim, Y.S., Kwag, W.J., Lee, B.K., Baek, K., 2008. Characterization of a novel anti-human TNF-alpha murine monoclonal antibody with high binding affinity and neutralizing activity. Experimental and Molecular Medicine 40: 35-42.
84. Stoddart, C.A., and Scott, F.W. 1989 Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus

- infection correlates with in vivo virulence. Journal of Virology 63: 436-440.
85. Takano, T., Azuma, N., Satoh, M., Toda, A., Hashida, Y., Satoh, R., Hohdatsu, T. 2009. Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. Archives of Virology 154: 775-781.
86. Takano, T., Hohdatsu, T., Hashida, Y., Kaneko, Y., Tanabe, M., Koyama, H. 2007. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. Veterinary Microbiology 119: 121-131.
87. 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 364: 64-72.
88. Takano, T., Katada, Y., Moritoh, S., Ogasawara, M., Satoh, K., Tanabe, M, Hohdatsu, T. 2008. Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. J. Gen. Virol. 89: 1025-1029.

89. Takano, T., Katoh, Y., Doki, T., Hohdatsu, T. 2013. Effect of chloroquine on feline infectious peritonitis virus infection in vitro and in vivo. Antiviral. Res. 99: 100-107.
90. Takano, T., Ohyama, T., Kokumoto, A., Satoh, R., Hohdatsu, T. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. Virus Research 158: 161-168.
91. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., Tak, P.P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action, a comprehensive review. Pharmacology & Therapeutics 117: 244-279.
92. Tresnan, D.B., Levis, R., Holmes, K.V. 1996. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. J. Virol. 70: 8669-8674.
93. Uchide, N., Ohyama, K., Bessho, T., Takeichi, M., Toyoda, H. 2012. Possible roles of proinflammatory and chemoattractive cytokines produced by human fetal membrane cells in the pathology of adverse pregnancy outcomes associated with influenza virus infection. Mediators of Inflammation 2012:270670.
94. Umehashi, M., Imamura, T., Akiyama, S., Tokiyoshi, S.

2002. Development and safety of mouse-cat chimeric antibody against the feline calicivirus. Journal of the Japan Veterinary Medical Association 55: 293-297.
95. Van, Hamme, E., Desmarests, L., Dewerchin, H.L., Nauwynck, H.J. 2011. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. Virus Res. 160: 32-39.
96. Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., Fiers, W., 1995. Two tumour necrosis factor receptors, structure and function. Trends in Cell Biology 5: 392-399.
97. Wang, J., Fu, Y.X. 2005. Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. Immunological Reviews 204: 144-155.
98. Weiss, R.C., Scott, F.W. 1981. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis, comparisons with dengue hemorrhagic fever. Comp. Immunol Microbiol Infect. Dis. 4: 175-189.
99. Wolfe, L.G. and Griesemer, R.A. 1966. Feline infectious peritonitis. Pathol. Vet. 3: 255-270.
100. Yeh, P., Landais, D., Lemaître, M., Maury, I., Crenne, J.Y., Crenne, J.Y., Becquart, J., Murry-Brelier, A., Boucher, F., Montay, G., Fleer, R., Mayaux, J.F., Klatzmann, D. 1992. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy, biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. Proc Natl Acad Sci U



S A 89: 1904-1908.

101. Yen, Y.T., Chen, H.C., Lin, Y.D., Shieh, C.C., Wu-Hsieh, B.A., 2008. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. Journal of Virology 82: 12312-12324.
102. Zettlmeissl, G., Gregersen, J.P., Dupont, J.M., Mehdi, S., Reiner, G., Seed, B. 1990. Expression and characterization of human CD4, immunoglobulin fusion proteins. DNA Cell Biol. 9: 347-353.