

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

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

獣医伝染病学 土岐 朋義

猫伝染性腹膜炎（Feline infectious peritonitis ; FIP）は FIP ウイルス（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。演者は、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。そこで演者は第 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、polycation 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、polycation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 feline TNF-alpha (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。このことを踏まえると、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。そこで演者は第 3 章において fTNF-alpha を認識する 9 種類の monoclonal antibody (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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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、プラセボ群の猫では、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 α 1-酸性糖タンパク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- α 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- α に対する反応性が低下する可能性が考えられた。そこで演者は第 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。演者が作製した chimeric mAb 2-4 は、抗猫 IgG 抗体と反応し、fTNF- α 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- α 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。

演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- α 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- α 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。