

反応させた FIPV (II 型 79-1146 株) を接種し、ウイルスレセプターに対する Mab の存在が、II 型 FIPV の猫マクロファージにおける ADE 発現にどのように影響するかを調べた。また、Fc レセプター陽性でウイルスレセプター陰性の U937 細胞における ADE 活性の有無を調べた。

2) 血清型の違いと ADE 発現の関係

SPF 猫に I 型あるいは II 型 FIPV 感染耐過ネコ血清を 3ml あるいは 30ml 皮下に受身免疫し、その 3 日後に I 型 FIPV KU-2 株 ($10^{4.3}$ TCID₅₀/頭) を接種することにより *in vivo* において ADE が誘導されるか否かを調べた。

猫を用いた動物実験は、北里大学動物実験指針に従い実施した。

C. 研究結果

1) ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与

猫マクロファージ (Fc レセプター陽性、ウイルスレセプター陽性) を使用した実験では、ADE 活性を持つ Mab を反応後に FIPV を接種した場合、ウイルスコントロールに比べ明らかな感染の増強が認められた (図 1、方法 D および C)。一方、ウイルスレセプターに対する Mab を反応後に FIPV を接種した場合、その感染は完全に抑制された (図 1、方法 B)。そこで、ウイルスレセプターに対する Mab を反応後、ADE 活性を持つ Mab と反応した FIPV を接種したところ明らかにその感染は増強された (図 1、方法 A)。すなわち、FIPV の ADE 発現にウイルスレセプターは必要ないという結果が得られた。さらに、U-937 細胞 (Fc レセプ

ター陽性、ウイルスレセプター陰性) (図 2 a) を使用した実験では、FIPV だけを接種した場合にはウイルス増殖は認められなかったが、ADE 活性を持つ Mab (抗 S 抗体) と FIPV の反応液を接種した場合には、ウイルス増殖が観察された。また、ウイルスにあらかじめ protein A を処理した抗 S 抗体を反応させた場合にはウイルス増殖は認められなかった (図 2 b)。

2) 血清型の違いと ADE 発現の関係

I 型 FIPV 感染耐過猫血清 (I 型 FIPV KU-2 に対する中和抗体価 1:320) を 6 頭の SPF 猫に 30ml (3 頭) あるいは 3ml (3 頭) 皮下投与した。3 日後の攻撃ウイルス (I 型 FIPV KU-2 株) に対する各猫の中和抗体価を図 3 に示した。 $10^{4.3}$ TCID₅₀ の FIPV KU-2 株を皮下接種した結果、対照群 (PBS 投与群) の 5 頭中 1 頭が 69 日目に死亡したのに対し、血清受身免疫群では 39 日以内に 6 頭全頭が死亡した (図 4)。対照群に比べ、I 型 FIPV に対する抗体を受身免疫した猫で明らかに発症率が高まり、また、生存期間も短かった。

同様に、II 型 FIPV 感染耐過猫血清 (II 型 FIPV 79-1146 株に対する中和抗体価 1:6400) を 6 頭の SPF 猫に皮下投与し、3 日後に 4 頭の対照群 (PBS 投与群) と共に $10^{4.3}$ TCID₅₀ の I 型 FIPV KU-2 株を皮下接種した。その結果、90 日の観察期間中、対照群では発症する猫はなく、生存率は 100%であった。血清投与群では、3ml の血清を投与した群の 1 頭のみが 59 日目に死亡し、30ml 投与群と合わせた生存率は 83%で対照群との間に有

意差は認められなかった (図 5)。図 6 に、ウイルス攻撃時の I 型 FIPV KU-2 株および II 型 FIPV 79-1146 株に対する各猫の中和抗体価を示した。

D. 考察

一般のウイルス感染症と同様に、FIPV 感染でも中和抗体を含む抗体価が上昇する。しかし、抗体はウイルス排除に効果がなく、むしろ FIP 発症を早める結果となる。FIPV に対する Mab を使用したこれまでの解析結果から、ADE に関するエピトープは主に S 蛋白質上に存在し、しかも、Fc レセプターを持たない細胞、例えばネコ腎株化細胞 (CrFK 細胞) で中和活性を持つ抗体が Fc レセプター陽性のネコマクロファージで強い ADE 活性を示すことが明らかとなっている。すなわち、中和と感染増強のエピトープが密接に関連していることが示唆されている。このことが FIP ワクチンの開発を困難なものにしている。

FIPV のマクロファージへの感染様式として 1) ウイルスレセプターを使用した感染、2) Fc レセプター介在性のエンドサイトーシス、3) ウイルスレセプターと Fc レセプターの相互作用による感染が提唱されている。ヒト免疫不全ウイルス感染症では、ADE 発現に Fc レセプターと共にウイルスレセプターである CD4 抗原が必要であることが報告されている。しかし、今回の報告で、FIPV 感染ではウイルスレセプターに対する Mab の存在が ADE 発現に影響しないこと、およびウイルスレセプターを持たない U937 細胞で ADE が発現することか

ら、ADE 発現にウイルスレセプターは必要ないことが明らかとなった。すなわち、FIPV のマクロファージへの感染様式としては上述の 1) と 2) の様式をとることが示唆された。

FIPV には I 型と II 型の 2 種の血清型が存在する。FIPV と同様に ADE が認められるデングウイルスは 4 種の血清型が存在し、異なる血清型の再感染時に ADE が発現することが知られている。しかし、FIPV 感染では、I 型 FIPV 抗体を受身免疫したネコでのみ同じ血清型の I 型ウイルスの感染に対して明らかに FIP 発症が早まった。すなわち、FIPV 感染の場合、同じ血清型のウイルスの再感染で ADE が発現することが示唆された。この結果は、II 型 FIPV を用いた *in vitro* での研究結果を支持するとともに、前述の中和に関するエピトープと ADE に関するエピトープが密接に関連するという考えを支持するものである。

最近、SARS ウイルスでも、ウイルスの細胞への侵入が抗体によって増強されることが報告された (Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, 102:797-801)。SARS ワクチン開発の過程でも ADE の危険性を十分に考慮しなければならないのかもしれない。FIPV 感染は、ADE 現象の動物モデルとして有用な研究課題と思われる。

E. 結論

1) ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与

II 型 FIPV (79-1146 株) の ADE 発現にはウイルスレセプターは必要なく、そのメカニズムとしては FC レセプター

を介したエンドサイトーシスが考えられた。

2) 血清型の違いと ADE 発現の関係

I 型 FIPV 抗体を受身免疫した猫でのみ、同じ血清型の I 型ウイルスの感染に

対して明らかに FIP 発症が増強された。すなわち、FIPV 感染の場合、同じ血清型のウイルスの再感染で ADE が発現することが示唆された。

図 1 猫マクロファージでの ADE 発現におけるウイルスレセプターとの関与

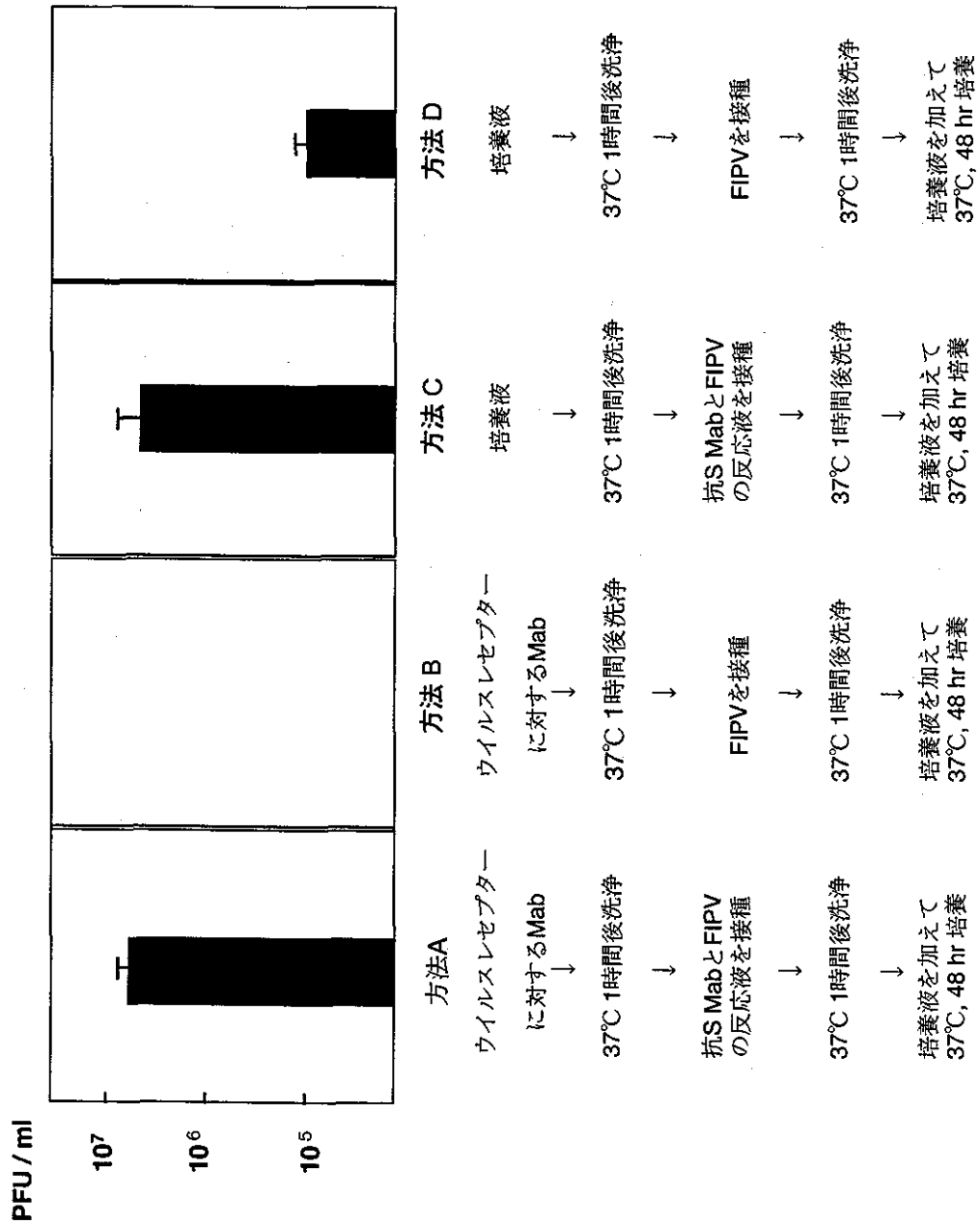
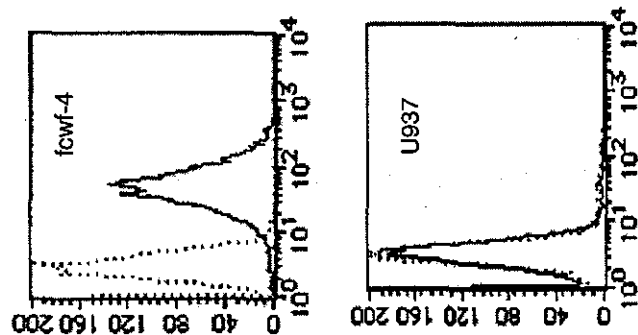


図 2 U937 細胞 (Fc レセプター陽性、ウイルスレセプター陰性) での ADE 活性

a) ウイルスレセプターを認識するMabの反応性



b) FIPVのU937細胞での増殖

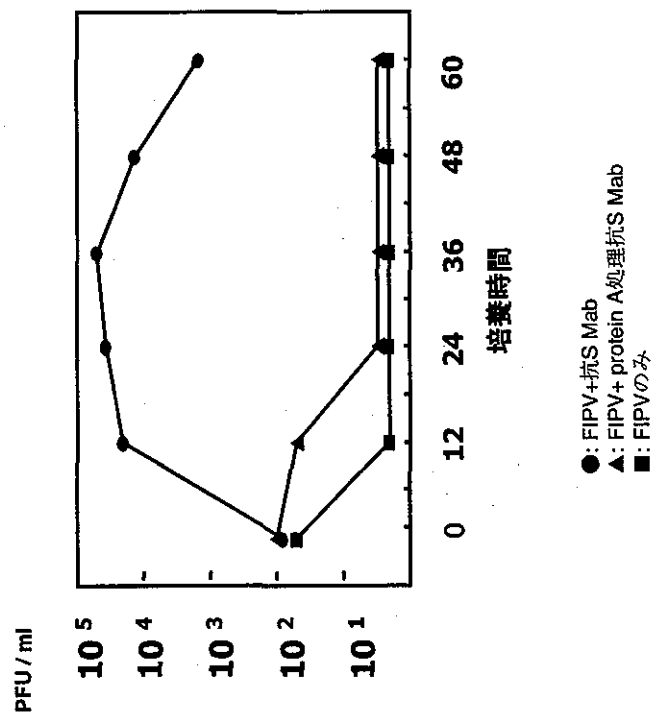


图 3 I 型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫した猫の I 型 FIPV に対する中和抗体価

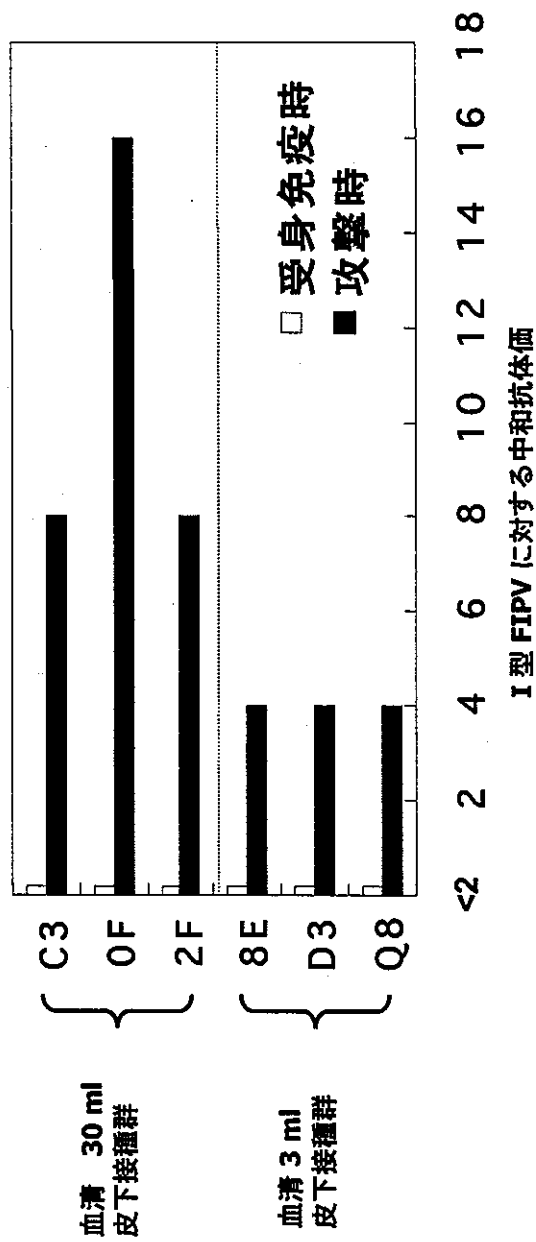


図4 I型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫し、I型 FIPV を接種した場合の生存率

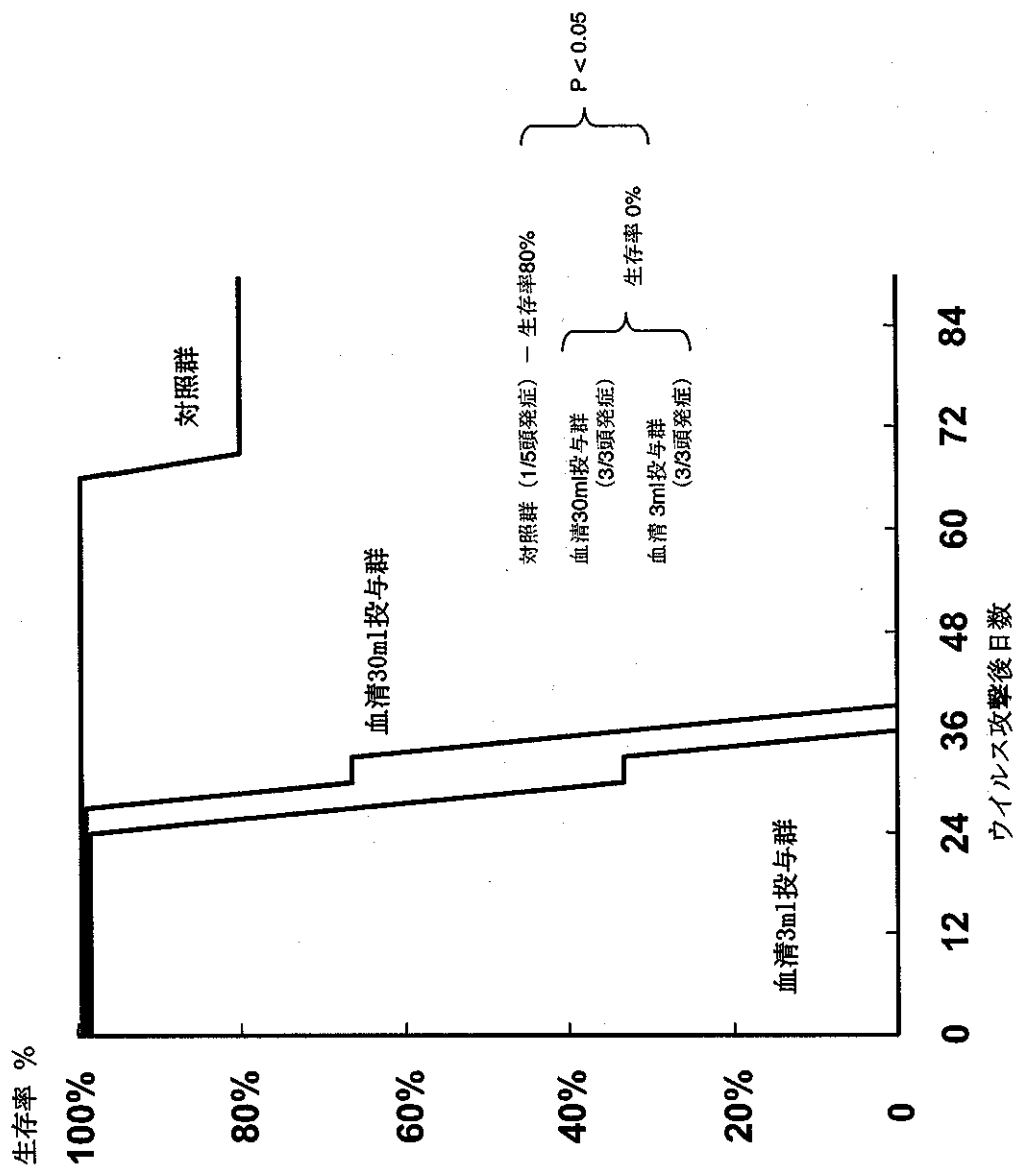


図 5 II 型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫し、I 型 FIPV を接種した場合の生存率

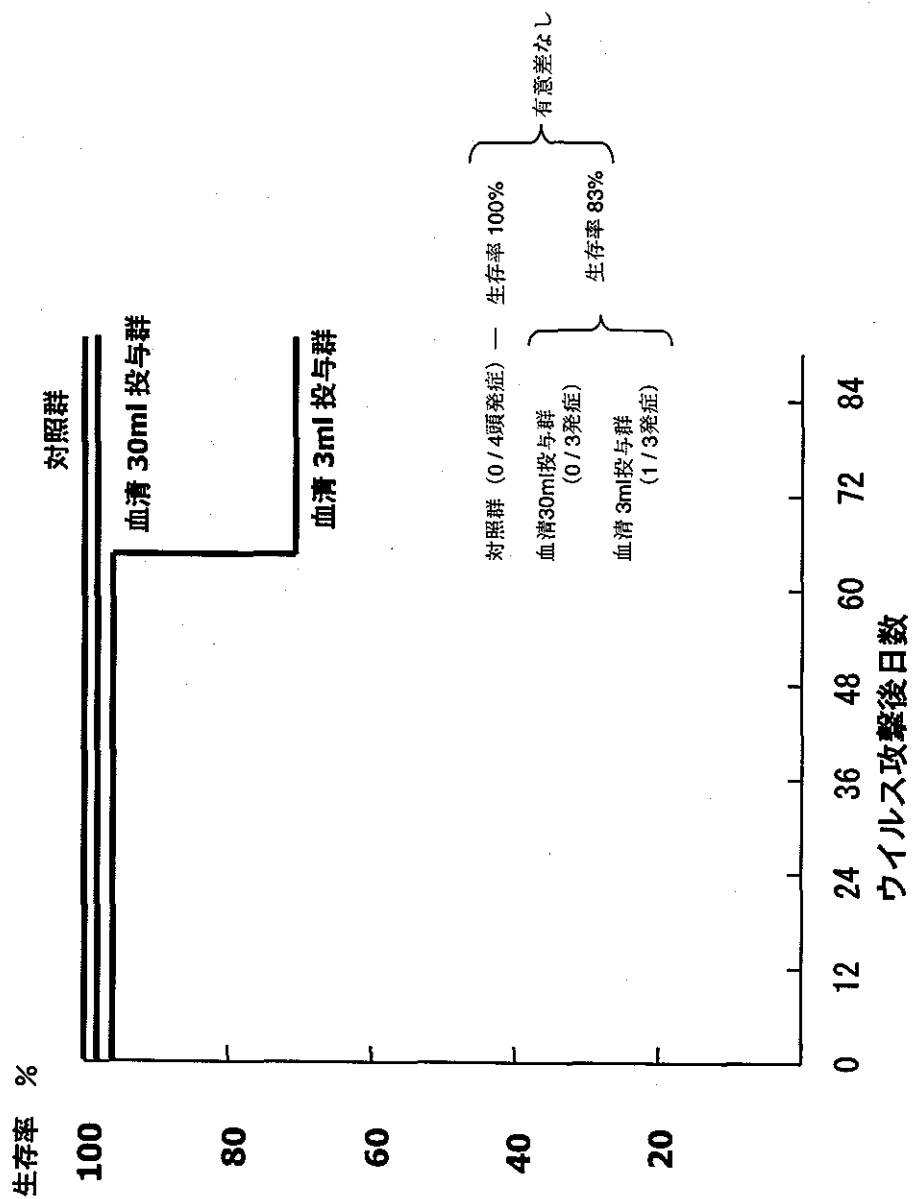
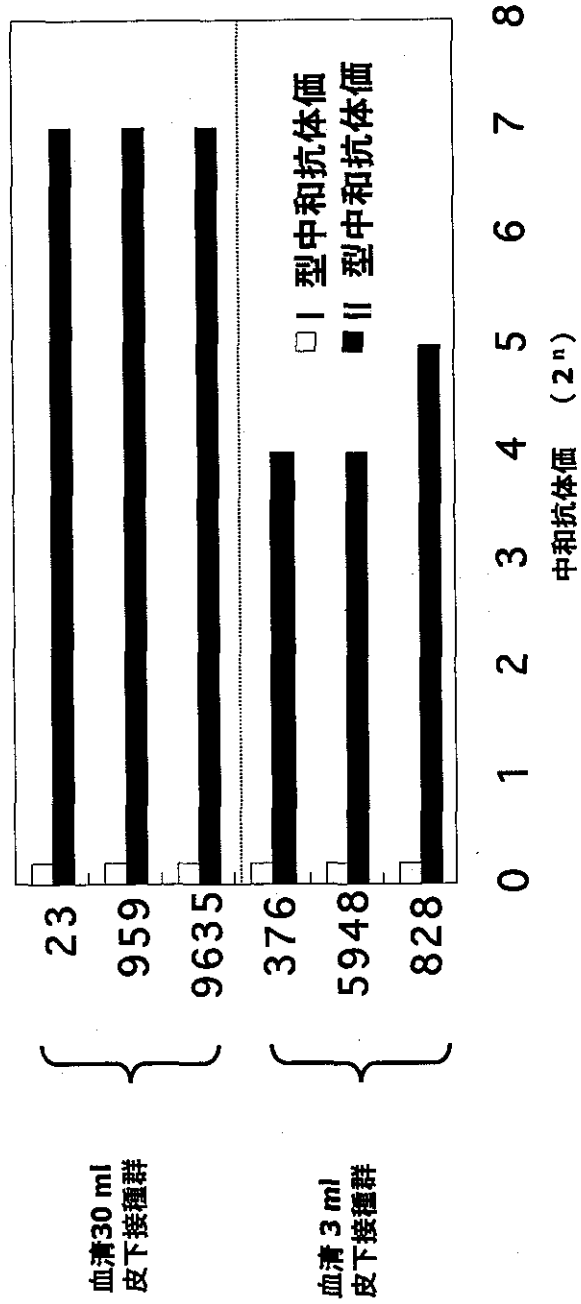


図 6 II 型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫した猫の I 型および II 型 FIPV に対する中和抗体価



動物コロナウイルスとそのウイルス受容体との相互作用の解析に関する研究

分担研究者 池田 秀利 動物衛生研究所 感染症研究部 複合感染症研究室長

研究要旨 豚のコロナウイルスである豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) とその宿主受容体、ブタアミノペプチダーゼ N(pAPN)の相互作用を解析することにより、TGEV の臓器指向性の解明することを目的とし、TGEV 非感受性のマウス由来 NIH3T3 細胞に Tag 抗原である FLAG 抗原を付加した pAPN (pAPN-FLAG) 遺伝子を導入、一過性発現させ TGEV への感受性を調査した。pAPN-FLAG 遺伝子を NIH3T3 細胞に導入した結果、pAPN-FLAG 蛋白発現が確認できた。感受性を調べるべく TGEV を遺伝子導入細胞に接種したところ、培養上清中・培養細胞中に含まれる感染性ウイルス力価は非常に低いかまたは検出できなかった。しかし TGEV 抗原陽性細胞の増加が確認された。以上の結果により TGEV への感受性を賦与できる pAPN-FLAG の一過性発現系が確立できたことから、今後は恒常的に pAPN-FLAG を発現する細胞株を樹立しさらなる解析を進めていきたい。

分担研究者 宮崎綾子、吉井雅晃、加藤花名子
動物衛生研究所 感染症研究部
複合感染症研究室

A. 研究目的

動物では様々なコロナウイルスが知られている。その中の一つである豚のコロナウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス (Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV) には腸管指向性を示す株 (腸管分離株) の他に呼吸器指向性を示す株 (呼吸器分離株) も存在することが知られている。TGEV で観察されるこの臓器指向性の違いを生むウイルス側の要因は S 蛋白の特定の部位に存在するアミノ酸の点変異にあるということが報告されている。一方、1980年代後半、TGEV の S 蛋白遺伝子が一部欠失した変異体で呼吸器指向性を持つ豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) が分離され、臓器指向性のウイルス側要因解明の一助となった。

現在 TGEV で用いられているワクチンは母豚の乳汁中の中和抗体価を高め、乳汁中の大量な抗体によって子豚の腸管をマスクし、ウイルス感染阻止効果を狙う乳汁免疫が主体となっている。しかし母豚へのワクチン接種が適正に行わ

れなければ子豚に十分なワクチン効果が得られないことから、接種が簡便で子豚への免疫効果の高いワクチンの開発が望まれている。TGEV の臓器指向性を解明・利用することによって、臓器指向性を利用したより免疫原性の高いワクチンや新しい粘膜免疫法の開発の可能性が生まれる。

本研究では TGEV の宿主受容体、アミノペプチダーゼ (pAPN) と TGEV との相互作用を分子レベルで解析することから TGEV の臓器指向性や病原性を解明することを目的とし、本年度は TGEV 非感受性のマウス由来 NIH3T3 細胞に Tag 抗原である FLAG 抗原を付加した pAPN を一過性に発現させ、TGEV への感受性について解析した。

B. 研究方法

① pAPN-FLAG 発現ベクターの構築；豚小腸上皮より mRNA を精製し、RT-PCR によって pAPN 遺伝子の cDNA を増幅、pCR2.1-Topo[®]にクローニングした。このプラスミドを鋳型として pAPN 遺伝子 5'末に *Xho*I サイトを付加したセンスプライマー (1S *Xho*I)、pAPN 遺伝子 3'末に FLAG 配列、*Bgl*II サイトを付加

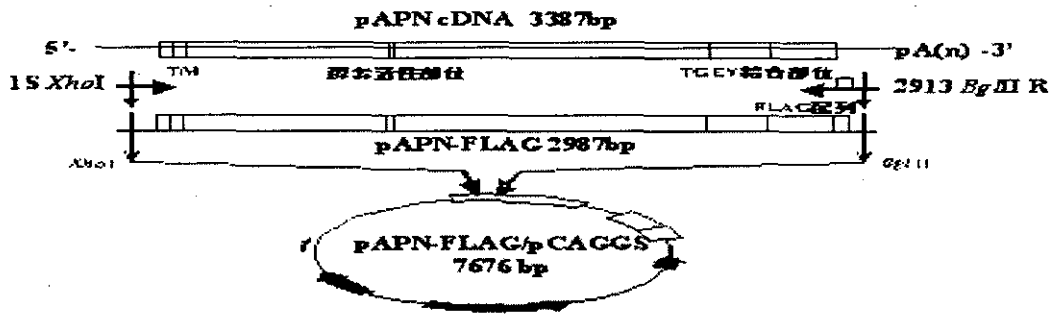


図-1 pAPN-FLAG発現ベクターの構築

したアンチセンスプライマー(2913FLAG R)を用いた PCR を行い、3'末に FLAG 配列を付加した pAPN 配列 (pAPN-FLAG) を得た (図-1)。pCR[®]-Blunt II-Topo[®]へクローニング、XhoI, BglII 消化後、ほ乳類細胞発現ベクターpCAGGS の XhoI, BglII サイトへ組み込み、pAPN-FLAG 発現ベクター (pAPN-FLAG/ pCAGGS) を得た (図-1)。

② NIH3T3 細胞における pAPN-FLAG の一過性発現；遺伝子導入試薬 Lipofectamine を用いて pAPN-FLAG/pCAGGS、陰性対象として遺伝子を挿入していない pCAGGS を TGEV 非感受性のマウス NIH3T3 細胞に導入した。pAPN-FLAG 発現について抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法 (IFA)、ウエスタンブロット法 (WB)、フローサイトメトリー法 (FACS) によって遺伝子導入後 4 日間観察した。

③ TGEV への感受性；遺伝子導入後 1 日目の細胞に TGEV TO163 株を接種 (moi=10) し、TGEV への感受性を接種後 1～3 日間、抗 TGEV ネコ血清を用いた蛍光抗体法によって鏡検した。また接種後 1～3 日間の培養上清、培養細胞を回収し、それぞれに含まれる感染性ウイルスの力価を TGEV 感受性 CPK 細胞で測定した。

(倫理面への配慮)

TGEVの感染実験、組換え実験は動物衛生

研究所微生物等管理要領、遺伝子組み換え生物等使用規定に準拠し、P2レベルで行った。

C. 研究結果

① pAPN-FLAG/pCAGGS を NIH3T3 細胞に遺伝子導入した結果、pAPN-FLAG 蛋白の発現は IFA による鏡検下では導入後 2 日目 (28%) をピークとして 4 日間確認でき (図-2 A)、その発現部位は主に細胞質であった (図-3)。次に抗 FLAG 抗体を用いた FACS によって細胞膜での pAPN-FLAG 蛋白発現を確認した。その結果、pCAGGS のみを導入した細胞では FLAG 抗原陽性率は 0%であったが、pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞では 0.6-2%と低い割合ながら細胞膜上での発現が確認できた (図-2 A)。ウエスタンブロットでは FLAG 抗体に反応する約 150kDa、130kDa の 2 本のバンドが検出された (図-2 B)。これは pAPN 蛋白の予測された分子量に近いものであった。

② pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞の TGEV への感受性を調べるために、導入後 1 日目に TGEV を接種した。陽性コントロールとして TGEV 感受性のブタ由来 CPK 細胞にも等量の TGEV を接種した結果、1 日目に CPE が現れ、2 日目には細胞は完全に剥離した。一方 pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞では観察期間中明瞭な CPE は認められなかった。蛍光抗体法によって TGEV 抗原陽性細胞数を経時的に調べ

たところ、接種後1～3日と TGEV 抗原陽性細胞数の増加が鏡検下にて観察された(図-3)。接種後1～3日間の培養上清、培養細胞を回収し、それぞれに含まれる感染性ウイルスの力価を測定した。今回の実験ではいずれにおいても感染性ウイルス力価は非常に低いか、検出できなかったが、pAPN 遺伝子に付加する Tag 抗原

を違えた数種の発現ベクターで同じ実験を行った際には、感受性のブタ由来 CPK 細胞に比べると感染性ウイルス力価は低いものの、力価の上昇がみられるものもあった。

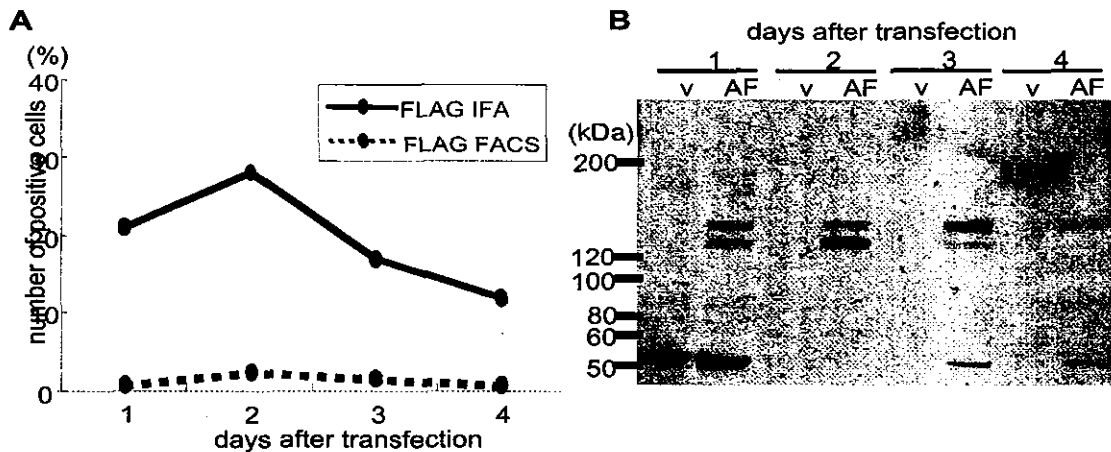


図-2 NIH3T3細胞におけるpAPN-FLAGの一過性発現。A: pAPN-FLAG一過性発現 NIH3T3細胞におけるFLAG抗原陽性細胞割合。直線は抗LAG抗体を用いた間接蛍光抗体法における鏡検結果、破線は抗LAG抗体を用いたFACSでのFLAG抗原陽性細胞割合を示している。B: 遺伝子導入後1-4日のpAPN-FLAG一過性発現NIH3T3細胞を可溶化、SDS-PAGE後、PVDF膜へ転写し、抗LAG抗体でpAPN-FLAGを検出した。v; 陰性対照として遺伝子を挿入していないpCAGGSを導入したNIH3T3細胞。AF; pAPN-FLAG/pCAGGSを導入したNIH3T3細胞。

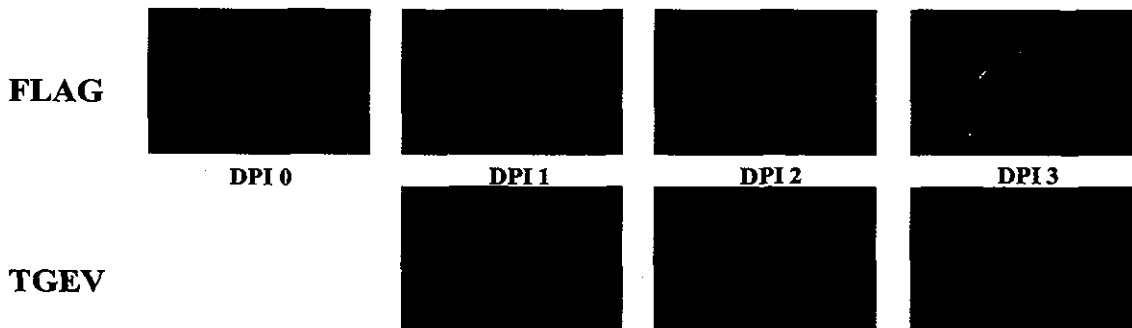


図-3 pAPN-FLAG一過性発現 NIH3T3細胞のTGEV感受性。 pAPN-FLAG遺伝子導入後1日目にTGEVを感染させ(DPI 0)、TGEV感受性を蛍光抗体法で導入後1-4日(DPI 0-3)間観察した。結果は下段に示している。上段は同条件での抗AG抗体を用いた間接蛍光抗体法の結果を示している。

D. 考察および結論

TGEV非感受性のマウス由来 NIH3T3細胞に Tag 抗原である FLAG 抗原を付加した pAPN (pAPN-

FLAG) 遺伝子を導入、一過性発現させ TGEV への感受性を調べた。pAPN-FLAG 遺伝子を NIH3T3 細胞に導入した結果、細胞膜上への発現は少なか

ったものの、pAPN-FLAG 蛋白発現細胞が確認できた。感受性を調べるために TGEV を接種したところ、TGEV 抗原陽性細胞の増加が確認できた。以上の結果により、pAPN-FLAG の一過性発現系が確立できたことから、今後は恒常的に pAPN-FLAG を発現する細胞株を樹立し、より詳細な pAPN-FLAG の発現状況、TGEV や他の CoV と pAPN-FLAG の相互作用について解析していきたい。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

- 1 学会発表 なし
- 2 論文発表 なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし