

表2. SARS S蛋白質結合に重要と考えられる  
各動物のACE2の部位の比較<sup>1)</sup>

Aa Position at ACE2	24	27	31	34	37	38	41	42	45	79	82	83	90	325	329	330	353	354
Human	Q	T	K	H	E	D	Y	Q	L	L	M	Y	N	Q	E	N	K	G
Cat	L	T	K	H	E	E	Y	Q	L	L	T	Y	N	Q	E	N	K	G
Ferret	L	T	K	Y	E	E	Y	Q	L	H	T	Y	D	E	Q	N	K	R
Mouse	N	T	N	Q	E	D	Y	Q	L	T	S	F	T	Q	A	N	H	G

1) Science 2005 (309) 1864-1868 Fang Li, et.al

2) 陰の部分はヒトACE2と異なるアミノ酸を示す

図2. 各動物のACE2を発現させたHeLa229細胞

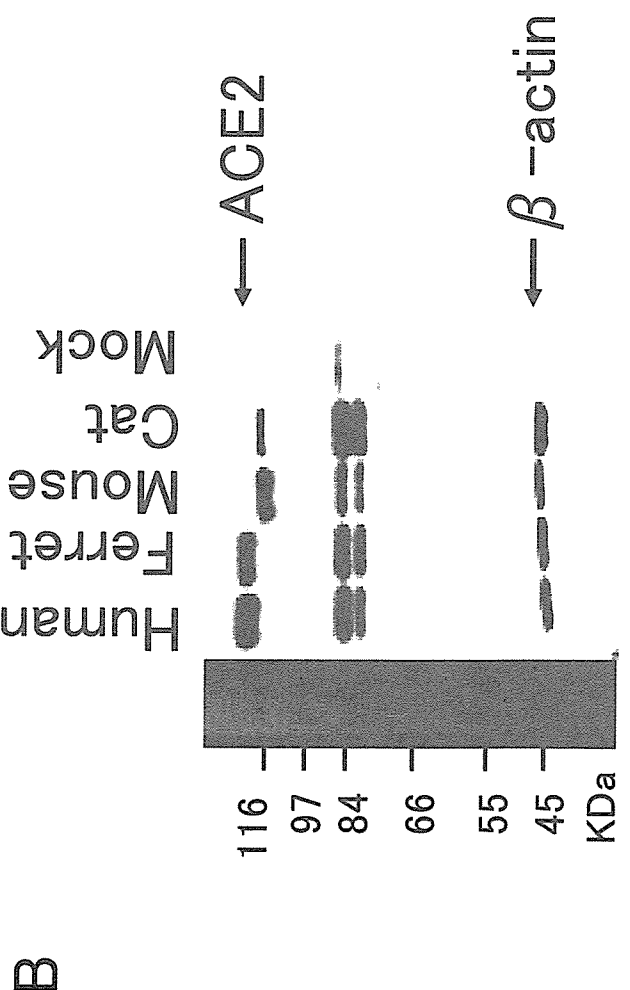
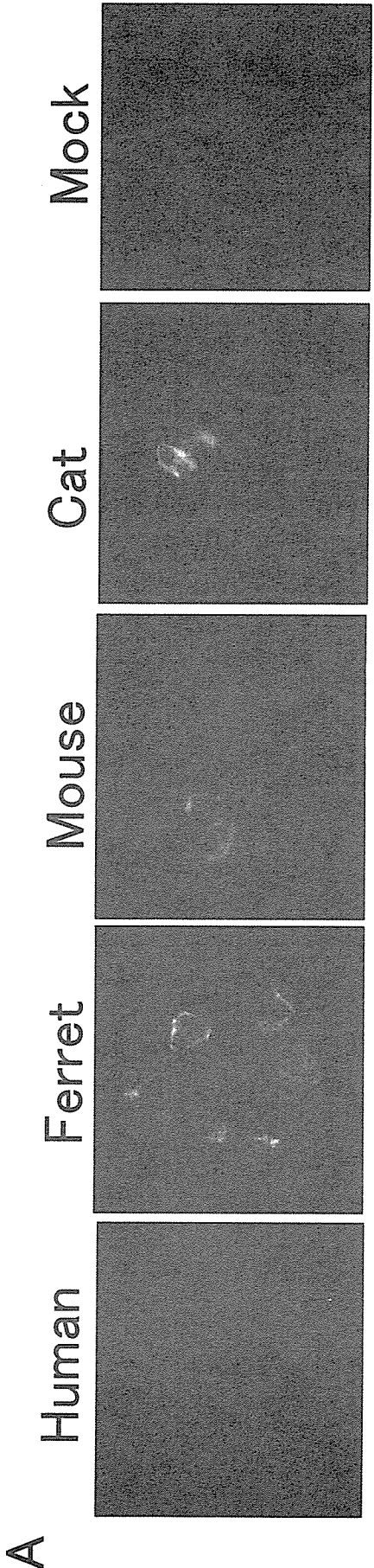
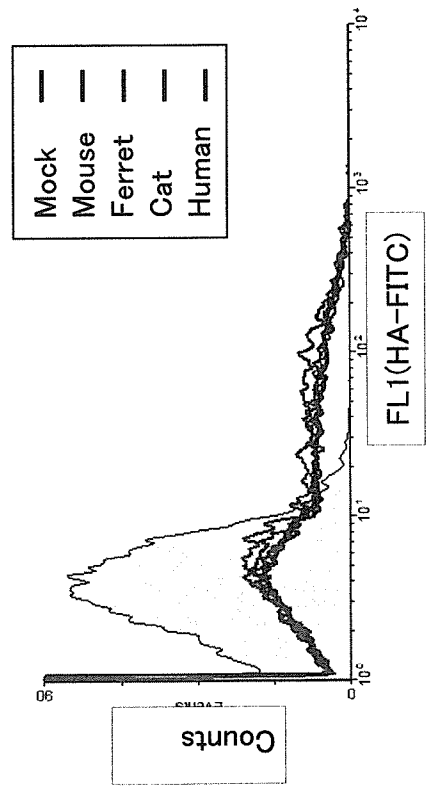


図3. 各動物のACE2-HeLaにおける  
ACE2発現量とSARS-CoVの増殖

A. ACE2発現量



B. SARS-CoV 感染

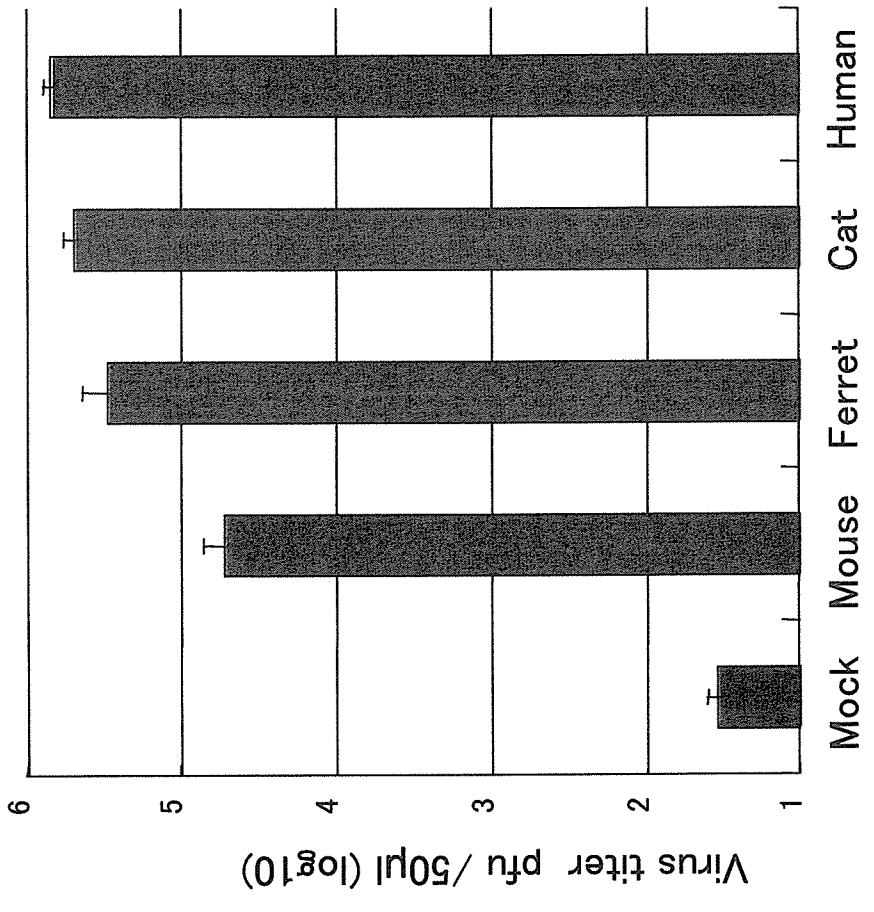
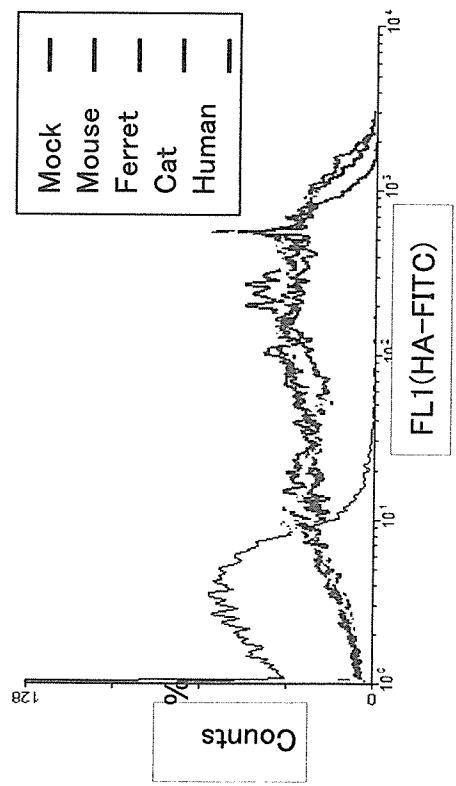
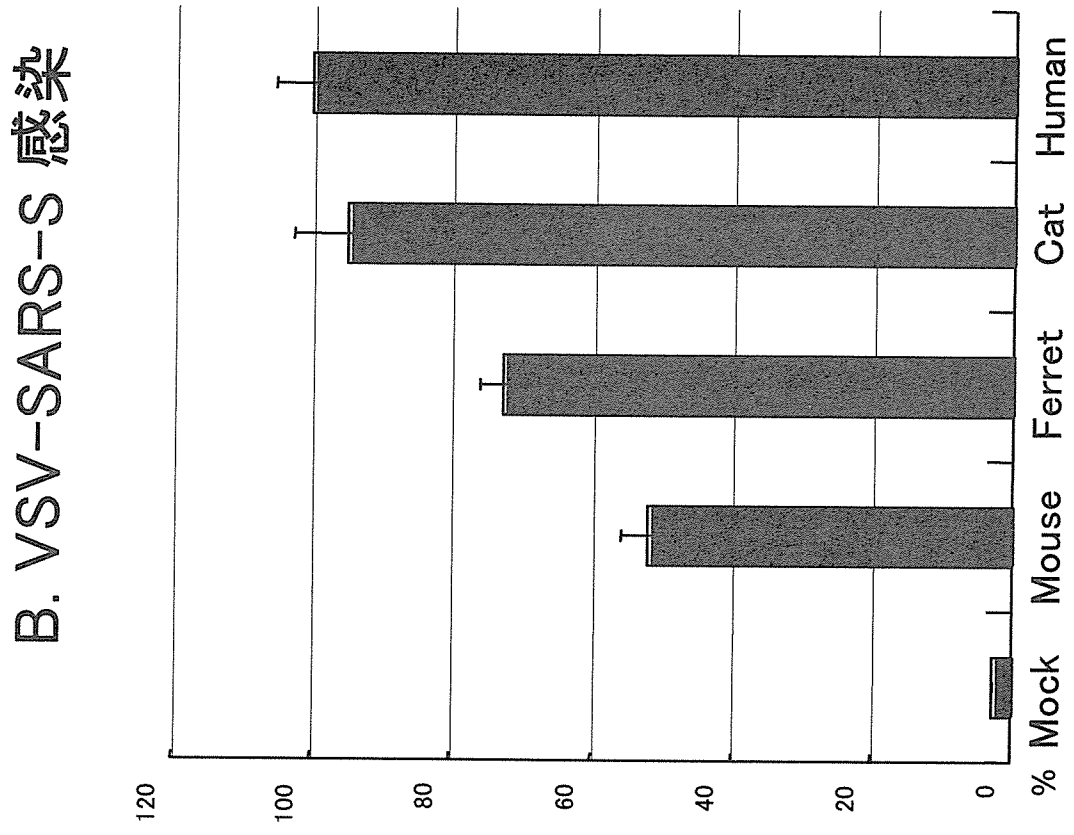
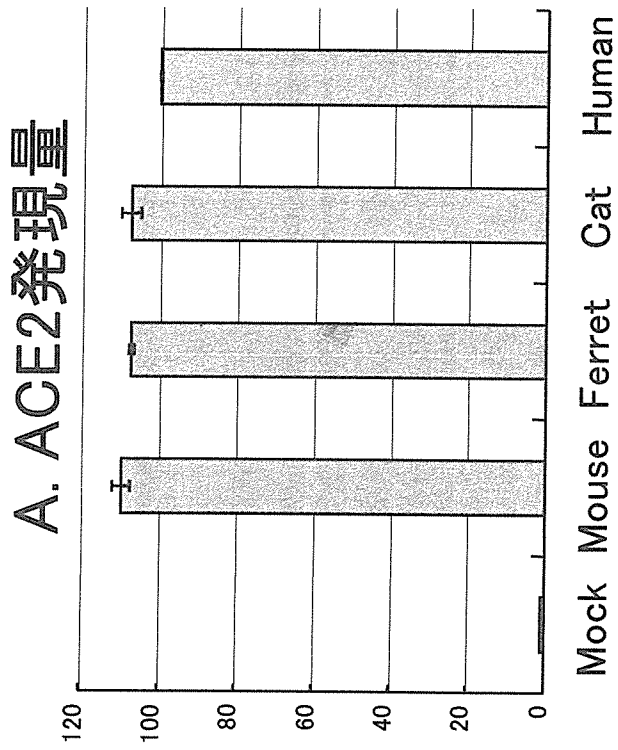


図 4. 各動物のACE2-293Tにおける  
ACE2発現量とVSV-SARS-Sの感染



猫コロナウイルス感染症に関する研究  
—猫伝染性腹膜炎（FIP）ウイルス感染における抗体介在性感感染増強作用と FIP 重症化機構—

分担研究者：宝達 勉（北里大学獣医畜産学部）

協力研究者：高野友美（北里大学獣医畜産学部）

**研究要旨** 猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）には、2種の血清型が存在し、ペプロマー（S）蛋白質に対する抗体の介在によりその感染が増強（ADE：抗体介在性感感染増強）される。この ADE は、ウイルス抗体複合体が Fc レセプターを介して細胞に侵入することによって起こる。また、猫伝染性腹膜炎（FIP）発症猫では、著しい lymphopenia が認められる。本研究では、1) ADE 発現にはウイルスレセプターは関与せず、同じ血清型の FIPV の再感染で誘導されること、2) FIP の病態形成には TNF $\alpha$ による T リンパ球のアポトーシスが関与しているが、マクロファージ（M $\Phi$ ）からの TNF $\alpha$ の産生は ADE 発現によって増強されること、3) ADE 発現により産生が増加した TNF $\alpha$ はパラクラインまたはオートクラインに M $\Phi$ に作用しウイルスレセプターであるアミノペプチダーゼ N の発現を upregulate することを明らかにした。

#### A. 研究目的

コロナウイルスは人をはじめ様々な動物に感染し、しばしば生命にかかわる重度の呼吸器系、消化器系、心血管系および神経系の疾患を引き起こす。2003年に突発した重症急性呼吸器症候群（SARS）もこのコロナウイルス感染に起因する。動物コロナウイルスのうち猫コロナウイルスは、致死性の猫伝染性腹膜炎（FIP）の原因ウイルス（FIPウイルス：FIPV）であり、液性抗体の存在が感染を早める特徴を持っている。この抗体介在性感感染増強（ADE）作用により、本疾病のワクチン開発はより困難なものとなっている。また、FIP発症猫ではアポトーシスによる T リンパ球の減少が著しい。FIPV は、マクロファージを標的細胞の1つとしているが、このマクロファージでの増殖が病原性発現に重要と考えられている。我々はこれまでに、1) 抗体と結合したウイルスが、抗体の Fc 部分とマクロファージの細胞表面に存在する Fc レセプターを介して感染し、それが感染増強の誘因となっていること、2) この ADE 作用は、FIPV のペプロマー（S）蛋白質に対する抗体によって誘導されること、3) S 蛋白質には ADE エピトープと同時に中和エピトープも存在しているが、

その両エピトープを区別できないことなどを報告した。しかし、ADE 発現時のウイルス侵入機構や ADE 発現と病態形成との関連など未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、1) FIPV 感染における ADE 活性の発現機序をより解析するために、ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与および ADE 発現と血清型の関係を明らかにする、2) FIP 発症猫で見られる lymphopenia の原因を明らかにすると共に、ADE 発現と lymphopenia の関係を調べる、3) ADE 発現と FIP 重症化の関係を明らかにすることを目的に実験を実施した。

#### B. 研究方法 および 研究成果

##### 1. ADE 発現におけるウイルスレセプターの関与

SPF 猫の肺胞マクロファージにウイルスレセプター（猫アミノペプチダーゼ）に対するモノクローナル抗体（Mab）を反応後、ADE 活性をもつ Mab（抗 S 抗体）を反応させた 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。

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) 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。

## 2. 血清型の違いと ADE 発現の関係

I 型あるいは II 型 FIPV 感染耐過ネコ血清を皮下に受身免疫し、その 3 日後に I 型 FIPV 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。

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 2 に示した。10<sup>4.3</sup> TCID<sub>50</sub> 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 3)。

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<sup>4.3</sup> TCID<sub>50</sub> 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 4)。図 5 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。

## 3. FIP 発症猫の lymphopenia と apoptosis の関係

(1) FIP 発症猫と FIP 発症を耐過した猫の PBMC における apoptosis 細胞の検出:

FIPV を実験感染後、FIP を発症した猫と発症を耐過した猫の PBMC を用いて TUNEL 法により apoptosis 細胞を検出し、SPF 猫での値と比較した。FIP 発症猫の PBMC では、apoptosis 細胞の陽性率が 23.4±16.7%であり、FIP の発症を耐過した猫の 0.9±1.3%および SPF 猫の 2.5±2.8%と比較して有意に高かった。

(2) FIP 発症猫由来材料の末梢血 CD4<sup>+</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup> 細胞および CD21<sup>+</sup> 細胞に対する apoptosis 誘導能:

SPF 猫の PBMC から CD4<sup>+</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup> 細胞および CD21<sup>+</sup> 細胞を magnetic beads 法により分離した。それらの細胞 (2×10<sup>6</sup> cells) を FIP 発症猫から採取した腹水 (最終濃度 1:40)、血漿 (最終濃度 1:40) および腹腔滲出細胞 (PEC) の培養上清 (最終濃度 1:2) と共

に 4 時間培養し、apoptosis が誘導されるか否かを検討した。その結果、すべての FIP 発症猫由来材料は、PBMC およびそのリンパ球サブセットである CD4<sup>+</sup> 細胞, CD8<sup>+</sup> 細胞および CD21<sup>+</sup> 細胞に対して容易に apoptosis を誘導した (図 6)。特に、CD8<sup>+</sup> 細胞において強く apoptosis が誘導されており、CD21<sup>+</sup> 細胞と比較して有意な差が認められた (腹水および PEC 培養上清では  $p<0.01$ 、血漿では  $p<0.05$ )。また、PEC 培養上清では、CD4<sup>+</sup> 細胞と CD8<sup>+</sup> 細胞との間にも有意差が認められた ( $p<0.05$ )。

腹水および PEC 培養上清の SPF 猫の PBMC に対する apoptosis 誘導能が apoptosis の細胞内シグナル伝達物質に対する阻害剤によって抑制されるか否かを調べた。阻害剤としては、caspase-3 inhibitor、caspase-8 inhibitor および p38-MAPK inhibitor を使用した。その結果、いずれの阻害剤においても濃度依存的に apoptosis の誘導が抑制された (図 7)。

(3) FIP 発症猫の PEC および PBMC における TNF- $\alpha$  mRNA の発現と PEC 培養上清および plasma 中の TNF- $\alpha$  の検出 :

FIP 発症猫の PEC と PBMC、SPF 猫の肺胞マクロファージと PBMC における TNF- $\alpha$  mRNA の発現量を測定した。TNF- $\alpha$  mRNA 発現量は、FIP 発症猫 ( $n=7$ ) の PEC で顕著に増加しており、SPF 猫 ( $n=6$ ) の肺胞マクロファージと比較して有意な差 ( $p<0.01$ ) が認められた。PBMC の比較でも同様の結果が得られ、SPF 猫に比べ FIP 発症猫でその発現量が有意に増加していた (図 8 A)。

FIP 発症猫由来の PEC 培養上清および血漿中に TNF- $\alpha$  が含まれるか否かを、TNF- $\alpha$  に感受性である WEHI-164 細胞に対する細胞傷害活性を指標として測定した。その結果、FIP cats 由来の PEC 培養上清および血漿は、いずれも濃度依存的に WEHI-164 細胞に対して細胞傷害活性を示した。しかし、SPF 猫由来の肺胞マクロファージと血漿では細胞傷害活性が認められなかった (図 8 B)。

#### 4. ADE 発現とリンパ球への apoptosis 誘導の関係

FIP 発症猫における apoptosis 誘導因子として同定された TNF- $\alpha$  のマクロファージでの発現が、FIPV の抗体を介したマクロファージへの感染により増強するか否かを調べた。すなわち、S 蛋白質に対する抗体と反応させた FIPV を、SPF 猫の肺胞マクロファージに接種し、3 日後に培養上清と cells を回収し、FIPV の増殖および TNF- $\alpha$  産生の測定を行った。マクロファージ培養上清中のウイルス産生量は plaque 法で、また、TNF- $\alpha$  量は WEHI 164 細胞に対する細胞障害活性を指標に測定した。FIPV と抗 S 抗体の mixture を接種したマクロファージの培養上清では、他の 3 群、即ち medium のみ、virus のみ、および抗 S 抗体のみをマクロファージに接種した群と比較してウイルス産生量および TNF- $\alpha$  産生量ともに有意に高い値が得られた (図 9 A)。また、細胞内の FIPV N 遺伝子および TNF- $\alpha$  mRNA 発現量を測定したところ、FIPV と抗 S 抗体の mixture を接種したマクロファージにおいて発現量の有意な増加が認められた (図 9 B)。即ち、ADE を発現したマクロファージでは、ウイルス産生量が増加するとともに、TNF- $\alpha$  産生量も増加していた。

さらに、これらのマクロファージの培養上清の SPF 猫 PBMC に対する apoptosis 誘導能を比較したところ、ウイルスと抗体を反応させて接種した場合に apoptosis 誘導率が明らかに増加していた (図 10)。

#### 5. ADE 発現と TNF- $\alpha$ の産生およびウイルスレセプター発現の関係

(1) FIP 発症猫および SPF 猫のマクロファージにおける FIPV N 遺伝子、TNF- $\alpha$  および APN mRNA の発現量 :

FIP 発症猫由来の肺胞マクロファージにおける FIPV N 遺伝子 および TNF- $\alpha$  mRNA 発現

量を SPF 猫由来の肺胞マクロファージと比較した。 FIP 発症由来の肺胞マクロファージでは FIPV N 遺伝子および TNF- $\alpha$  mRNA 発現量が増加していた (図 11 A、B)。 また興味あることに FIP 発症由来の肺胞マクロファージではウイルスレセプターである fAPN の mRNA 発現量も増加していた (図 11 C)。

(2) 培養 *feline macrophage* における fAPN mRNA 発現と FIPV 感染の関係 :

FIP 発症猫由来の肺胞マクロファージでは FIPV N 遺伝子発現量の増加とともに TNF- $\alpha$  mRNA 発現量の増加、さらには fAPN mRNA 発現量の増加が認められた。そこで、FIPV 感染肺胞マクロファージにおける FIPV N 遺伝子発現量と fAPN mRNA 発現量の変化を比較した。 FIPV または FIPV と抗 S 抗体の *mixture* を SPF 猫由来の肺胞マクロファージに接種したところ、細胞内 FIPV N 遺伝子の発現量の増加とともに fAPN mRNA 発現量の増加が認められた (図 12)。

(3) FIPV 感染マクロファージ培養上清中における fAPN 誘導因子の存在:

FIPV 感染マクロファージ培養上清中に fAPN 誘導因子が存在するか否かを調べた。 FIPV と抗 S 抗体の *mixture* を接種し 3 日間培養したマクロファージの培養上清中のウイルスを 56°C、30 分で熱不活化した。その熱処理したマクロファージ培養上清を 10% 加えた *medium* で新たに肺胞マクロファージを培養した。その後、マクロファージ細胞内 fAPN mRNA 発現量および細胞表面の fAPN 発現量の測定を経時的に行った。対照としてウイルスを接種していないマクロファージの培養上清を同様に熱処理したものを加えた培養液で肺胞マクロファージを培養した。マクロファージ細胞内 fAPN mRNA 発現量および細胞表面の fAPN 発現量は共に対照のマクロファージ培養上清を処理した場合と比較して、FIPV と抗 S 抗体の *mixture* を接種したマクロファージの培養上清を加えて培養した時に有意な増加が認められた (図 13)。

(4) *feline recombinant TNF- $\alpha$*  処理マクロファージにおける fAPN 発現量の変化 :

FIP 発症猫由来の肺胞マクロファージや *in vitro* で FIPV を接種したマクロファージでは、TNF- $\alpha$  産生量の増加とともに fAPN mRNA 発現量が増加していた。そこで、TNF- $\alpha$  と fAPN 発現の関係を調べるために *feline recombinant TNF- $\alpha$*  を培養マクロファージに処理し、fAPN 発現量の変化を調べた。即ち、*feline recombinant TNF- $\alpha$*  を加えた *medium* で肺胞マクロファージを 5 日間培養し、細胞内 fAPN mRNA 発現量および細胞表面の fAPN 発現量を経時的に測定した。 TNF- $\alpha$  を 1ng/ml または 10ng/ml 加えて培養したところ、いずれも培養 3 日目および 5 日目において、対照群(TNF-alpha 0ng/ml)と比較して fAPN mRNA 発現量の有意な増加が認められた(図 14 A)。また、マクロファージ表面の fAPN 発現量も、TNF- $\alpha$  を 10ng/ml を加えて 5 日間培養したマクロファージで対照群と比較して有意な増加が認められた(図 14 B)。

(5) *feline recombinant TNF- $\alpha$*  処理マクロファージでの FIPV 増殖 :

*feline recombinant TNF- $\alpha$*  存在下で培養したマクロファージの FIPV 感染に対する影響を調べた。即ち、マクロファージにおける fAPN 発現の増加が FIPV のマクロファージに対する感染性を高めるかどうかを調べた。TNF- $\alpha$  を加えた *medium* で 5 日間培養したマクロファージに FIPV を接種し、経時的に培養上清中のウイルス産生量を測定した。TNF- $\alpha$  を加えて培養したマクロファージに FIPV を接種した場合、TNF- $\alpha$  を加えないで培養したマクロファージと比較して FIPV 産生量の有意な増加が認められた (図 15)。 その産生量は、培養液に加える TNF- $\alpha$  の濃度に依存して増加した。



### C. 考察

FIP の病態形成は、宿主の免疫状態、特に細胞性免疫 (TH1 活性) 誘導の有無に強く依存すると考えられている。すなわち、細胞性免疫が強く誘導されると FIP 発症が阻止される。FIP 発症猫では末梢血中の CD4<sup>+</sup> 細胞や CD8<sup>+</sup> 細胞を含む T 細胞数の減少が著しい。液性免疫 (TH2 活性) の誘導は無効かむしろ病状を悪化させると考えられている。抗体陽性猫に FIPV を接種すると、抗体陰性猫と比べて FIP 発症の時期が早まり、症状が重篤になる。この ADE 発現に伴う病態悪化は FIPV が抗体と結合することでマクロファージへの感染効率が上昇し、その結果、ウイルス産生量が増加するために起きると理解されている。本研究では、ADE 発現にはウイルスレセプターは関与せず、同じ血清型の FIPV の再感染で誘導されること、および抗体と FIPV の mixture を接種したマクロファージ (ADE induced-FIPV infected macrophage) ではウイルス産生量の増加と共に TNF- $\alpha$  産生も増加することを示した。また、ADE induced-FIPV infected macrophage の培養上清には猫 PBMC に対する apoptosis 誘導能が増加することを示した。さらに、FIP 発症猫由来のマクロファージでは FIPV のウイルスレセプターである fAPN の mRNA 発現量が増加していることを初めて発見した。また、我々は *in vitro* で FIPV を感染させたマクロファージ、特に ADE induced-FIPV infected macrophage で fAPN 発現が増加することを示した。さらに、この macrophage 培養上清中に fAPN 発現を誘導する因子が存在することも確認した。この培養上清を 56°C、30 分で処理しても fAPN 発現の誘導能は失活しなかったことから、この因子は耐熱性であることが考えられた。前述のように FIPV 感染マクロファージ培養上清中には TNF- $\alpha$  が増加しており、さらには TNF- $\alpha$  が熱耐性の物質であることから、この fAPN 誘導因子が TNF- $\alpha$  ではないかと予想された。この仮説を実証するために、feline recombinant TNF- $\alpha$  をマクロファージに処理し fAPN 発現への影響を調べた。結果は、我々

の予想通り、マクロファージの fAPN 発現量が増加した。おそらく、FIPV 感染マクロファージでは、FIPV 増殖に伴い TNF- $\alpha$  が産生され、その TNF- $\alpha$  が autocrinally または paracrinally にマクロファージに作用し、fAPN 発現を促すのではないかと考えられた。また、我々は feline recombinant TNF- $\alpha$  を処理したマクロファージに FIPV を感染させると、FIPV 産生量が増加することを示した。FIPV 以外のウイルス感染症においても TNF- $\alpha$  がウイルス感染に影響することが知られている。Ebola virus 感染症では TNF- $\alpha$  の作用により、ウイルスが血管内皮細胞に侵入しやすくなることが報告されている。また、rhinovirus 感染症の場合、細胞に TNF- $\alpha$  を処理した後にウイルスを感染させると、何も処理しない細胞に感染させたときよりも感染効率が上昇することが報告されている。これは rhinovirus のウイルスレセプターである ICAM-1 の発現量が増加するためと考えられている。FIPV 感染の場合も、マクロファージに TNF- $\alpha$  が作用することで fAPN 発現量が増加し、その結果、FIPV に対する感受性が増加したものである。

本研究の結果から、FIPV に感染した猫では、液性免疫が誘導されると、ADE 発現によりマクロファージでのウイルス増殖が増加すると共に TNF- $\alpha$  の過剰発現を招き、その結果、1) リンパ球の apoptosis 誘導、2) マクロファージでのウイルスレセプター (fAPN) 発現増加によるウイルス感受性の up-regulate などにより FIP 発症を早めているのではないかと考えられた。FIP の病態発生機序は複雑であり未解明な点が多い。今回の報告は FIP への発症過程をマクロファージでのウイルス増殖という視点から捉えたものであり、FIP の病態を理解する上で重要な発見と思われる。今後は細胞性免疫誘導との balance を含めた検討が望まれる。

#### D. 結論

FIPV 感染における ADE 発現と FIP 発症に関して、1) ADE 発現にはウイルスレセプターは関与せず、同じ血清型の FIPV の再感染で誘導されること、2) FIP の病態形成には TNF  $\alpha$  による T リンパ球のアポトーシスが関与しているが、マクロファージからの TNF  $\alpha$  の産生は ADE 発現によって増強されること、3) ADE 発現により産生が増加した TNF  $\alpha$  は autocrinally または paracrinally にマクロファージに作用しウイルスレセプターであるアミノペプチダーゼ N の発現を upregulate することを明らかにした。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. *Vet. Microbiol.* 119: 121-131.

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*, In press.

##### 2. 学会発表

高野友美、宝達 勉、橋田好兼、金子泰広、田邊真紀、小山弘之：猫伝染性腹膜炎（FIP）発症ネコにおける apoptosis 因子の検出 第 140 回日本獣医学会学術総会、鹿児島、2005 年 9 月。

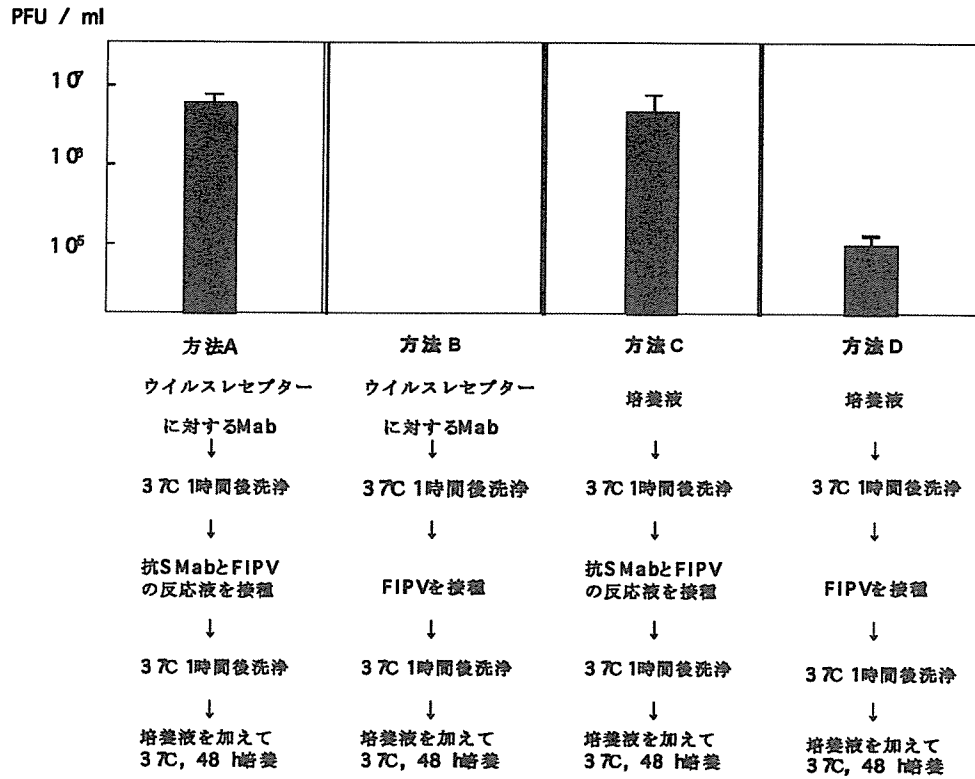


図 1 猫マクロファージでADE 発現におけるウイルスレセプターの関与

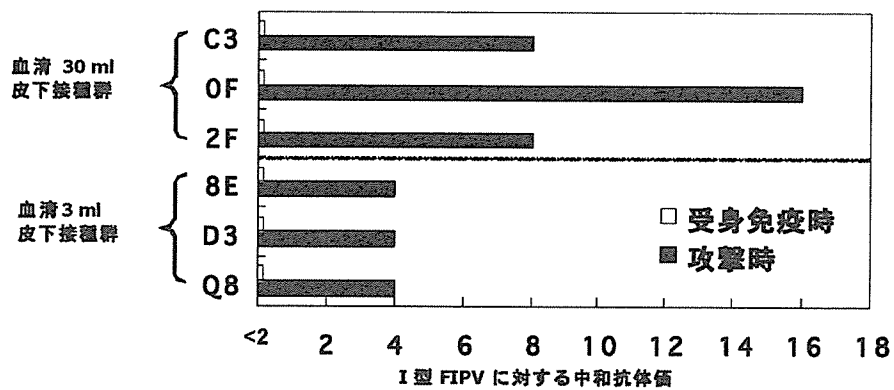


図 2 I型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫した猫の型 FIPV に対する中和抗体価

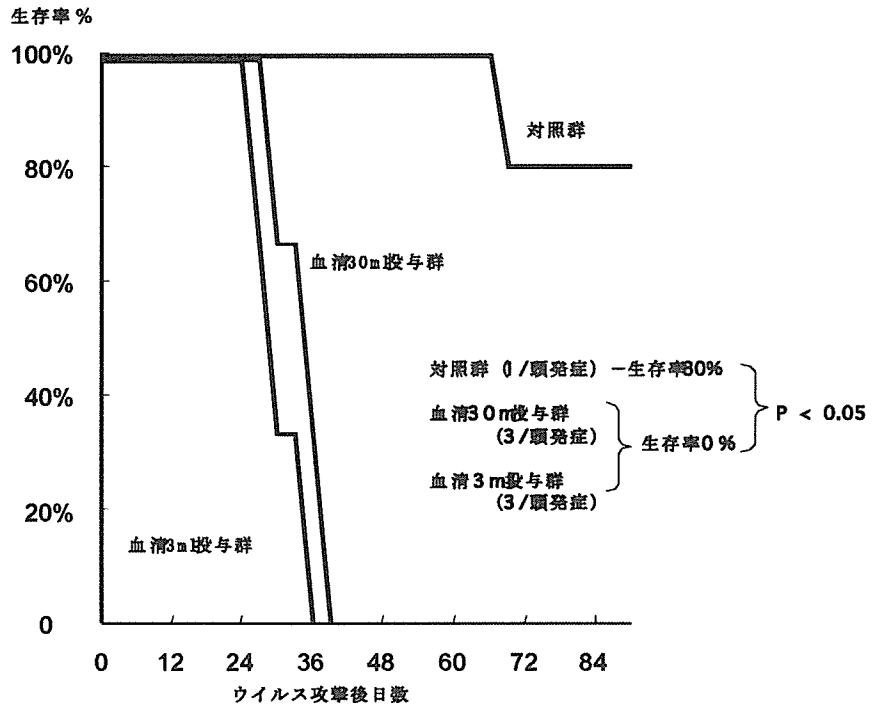


図 3 I型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫し、I型 FIPV を接種した場合の生存率

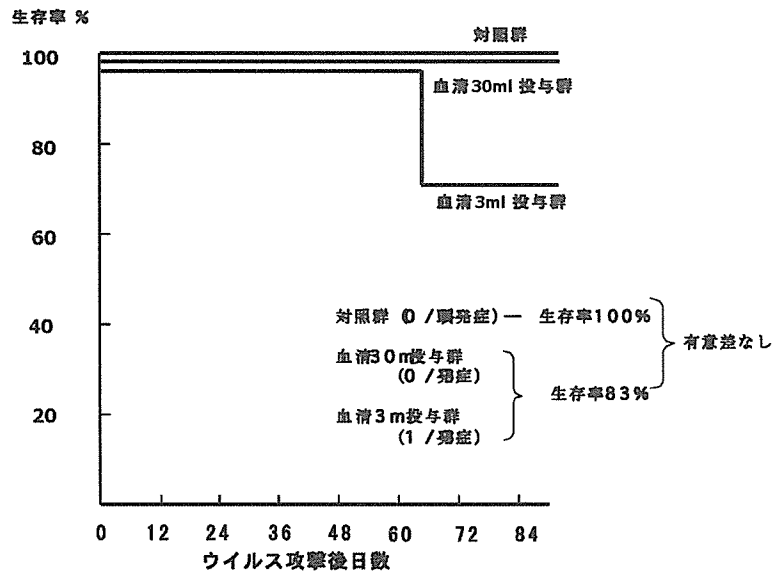


図 4 II型 FIPV 感染耐過猫血清を受身免疫し、II型 FIPV を接種した場合の生存率

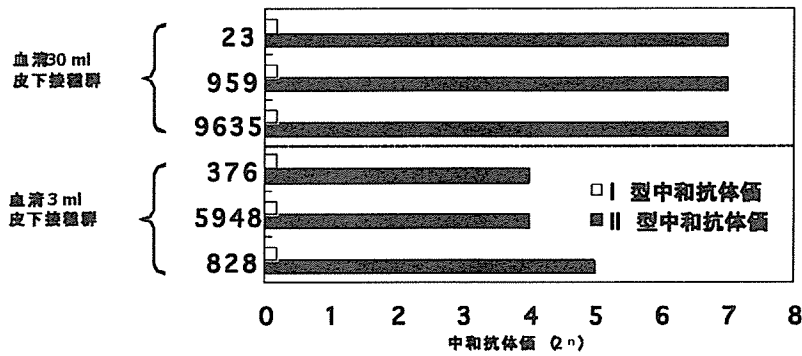


図5 II型FIPV感染耐過猫血清を受身免疫した猫型およびII型FIPVに対する中和抗体価

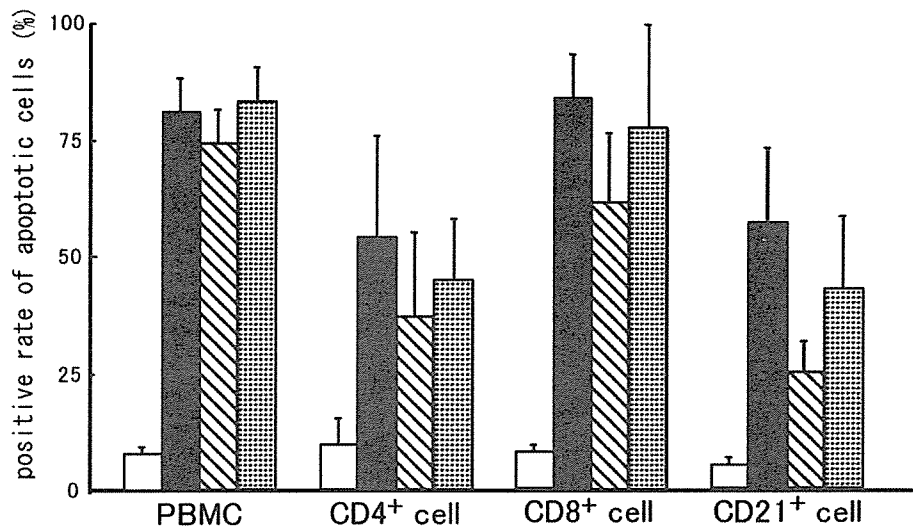


図6 FIP猫由来材料のperipheral CD4<sup>+</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup> 細胞およびCD21<sup>+</sup> 細胞に対するapoptosis誘導能:  $2 \times 10^6$  cellsのSPF猫のPBMCおよびそのリンパ球サブセット(CD4<sup>+</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup> 細胞、CD21<sup>+</sup> 細胞)をFIP猫の腹水、FIP猫由来PEC培養上清またはFIP猫の血漿と共に37°Cで4時間培養し、TUNEL法でapoptotic cellsを検出した。CD4<sup>+</sup> 細胞、CD8<sup>+</sup> 細胞およびCD21<sup>+</sup> 細胞はmagnetic beads法により回収した。  
medium: □、FIP猫の腹水: ■、FIP猫由来PEC培養上清: ▨、FIP猫の血漿: ▩

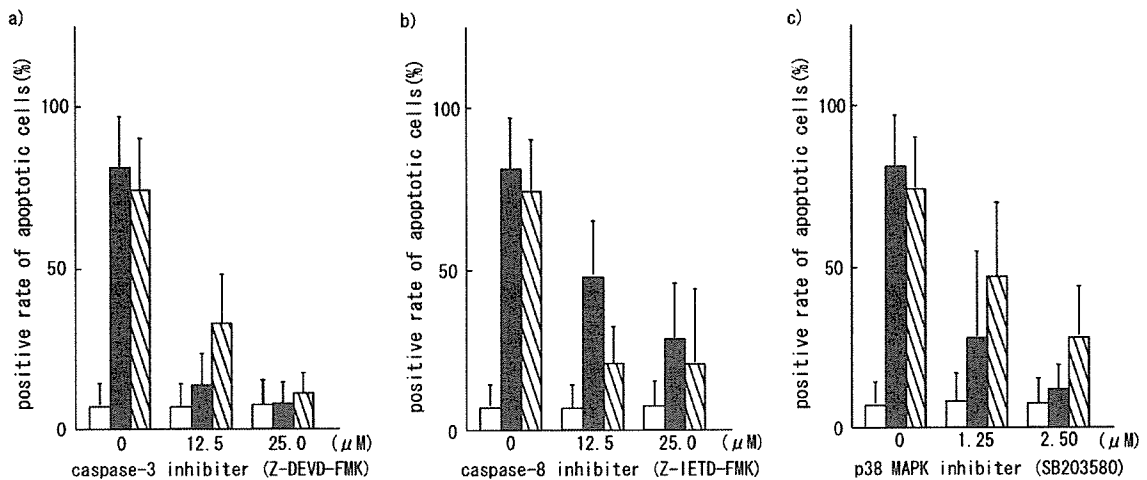


図7 PBMCのapoptosisにおける細胞内シグナル伝達物質阻害剤の影響。a, b; SPF猫のPBMCをcaspase-3 inhibitorまたはcaspase-8 inhibitorで2時間反応後、FIP猫の腹水、FIP猫由来PEC培養上清と共に37°Cで培養した。4時間反応後、TUNEL法でapoptotic cellsを検出した。c; SPF猫のPBMCをFIP catの腹水、FIP猫由来PEC培養上清と共に37°Cで培養した。1時間反応後、p38-MAPK inhibitorを加えた。その後3時間培養し、TUNEL法でapoptotic cellsを検出した。  
medium :□、FIP猫の腹水 :■、FIP猫由来PEC培養上清 :▨

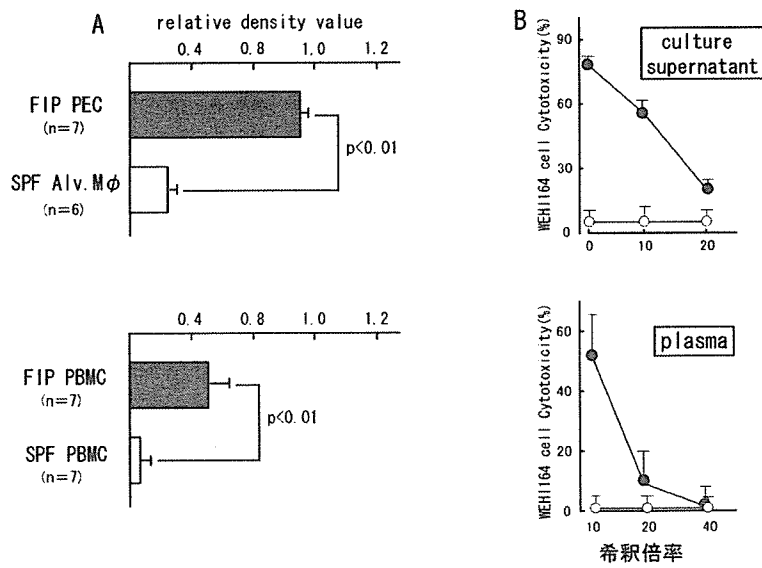


図8 FIP猫のPECおよびPBMCにおけるTNF- $\alpha$  mRNAの発現とPEC培養上清および血漿中のTNF- $\alpha$ の検出。(A)FIP猫のPECとSPF猫のalveolar macrophage、FIP猫およびSPF猫のPBMCを回収し、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。TNF- $\alpha$  mRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNAに対する相対的発現量 (relative density value) として定量的に解析した。(B)FIP catのPECまたはSPF catのmacrophageの培養上清、FIP猫またはSPF猫の血漿を用い、WEHI 164 cellに対する細胞傷害率を指標としたTNF- $\alpha$ の測定を行った。  
FIPネコ由来 :● SPFネコ由来 :○

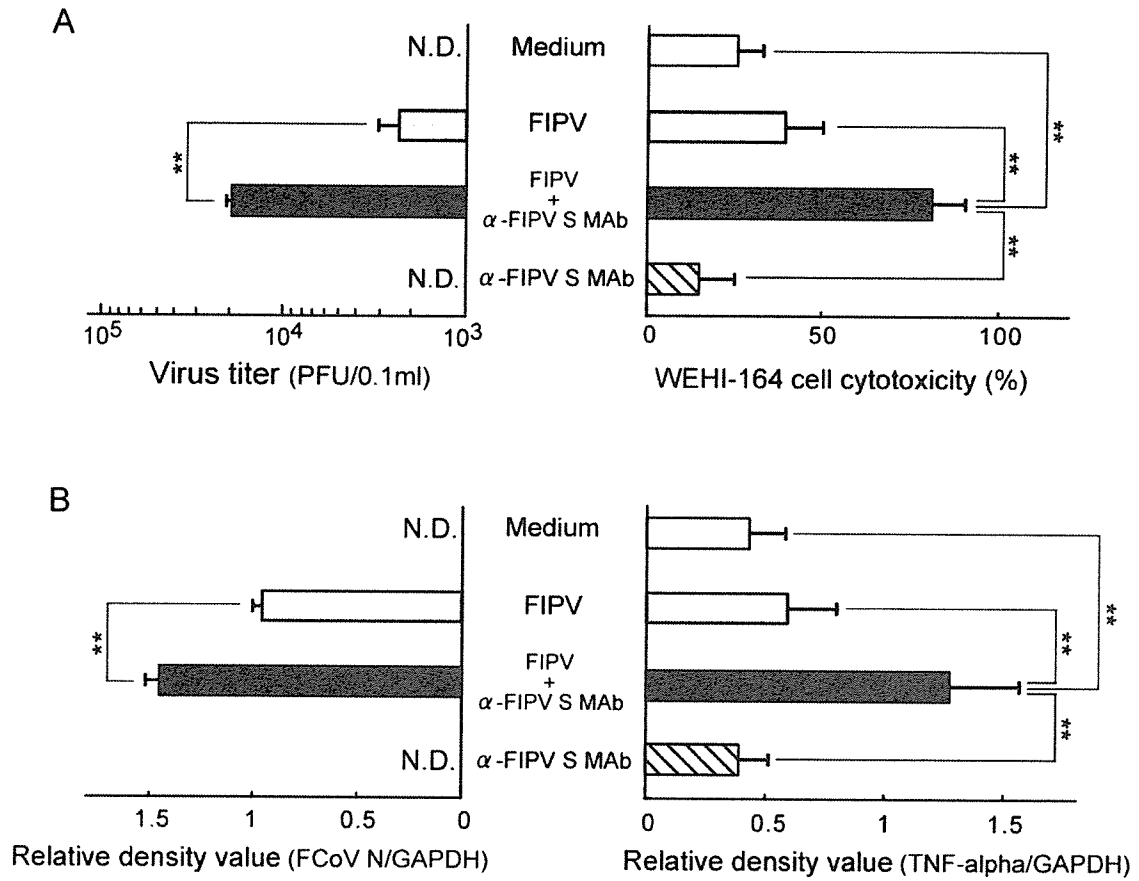


図9 猫マクロファージにおける感染とNF- $\alpha$ 産生の関係。SPF猫のマクロファージ(2 $\times$  10<sup>6</sup>)に medium, FIPV, FIPV+ $\alpha$ -S MAb, または $\alpha$ -S MAbを接種し3日後に細胞および培養上清を回収した。その plaque法により培養上清中のウイルス力価を測定するとともに、WEHI-164細胞に対する細胞傷害活性を指標にNF- $\alpha$ 産生量を測定した。また、RT-PCRによって細胞内FIPV N遺伝子(B、左)およびNF- $\alpha$  mRNA (B、右)を検出した。\* p<0.01. N.D. Not Detected.

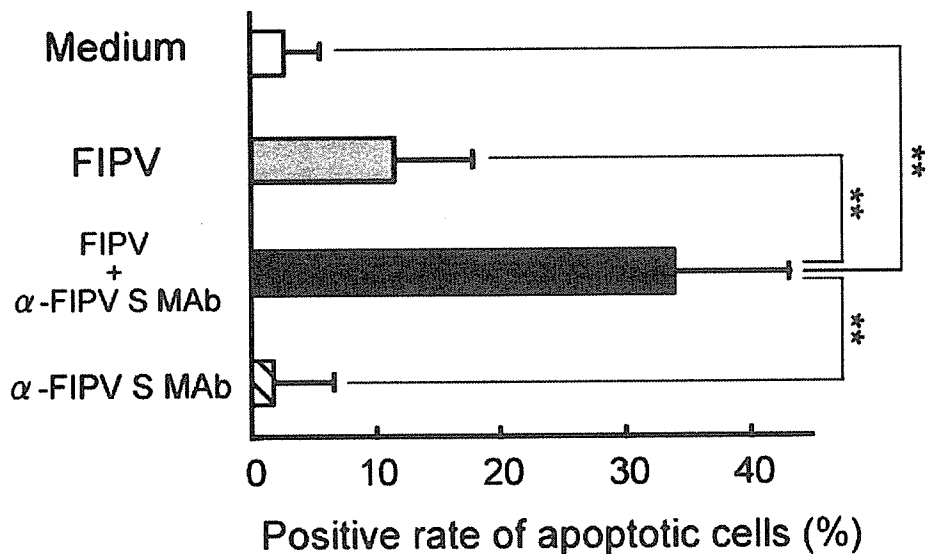


図10 FIPV感染マクロファージ培養上清のICに対するapoptosis誘導能  
SPF猫のマクロファージ(2×10<sup>6</sup>)にmedium, FIPV, FIPV+ α-FIPV S MAb、またはα-FIPV MAbを接種し3日後に培養上清を回収したPF猫のPBMC (2×10<sup>6</sup>)を、回収した各々の培養上清と共に4時間培養しTUNEL法によってアポトーシス誘導の有無を調べた(p<0.01).

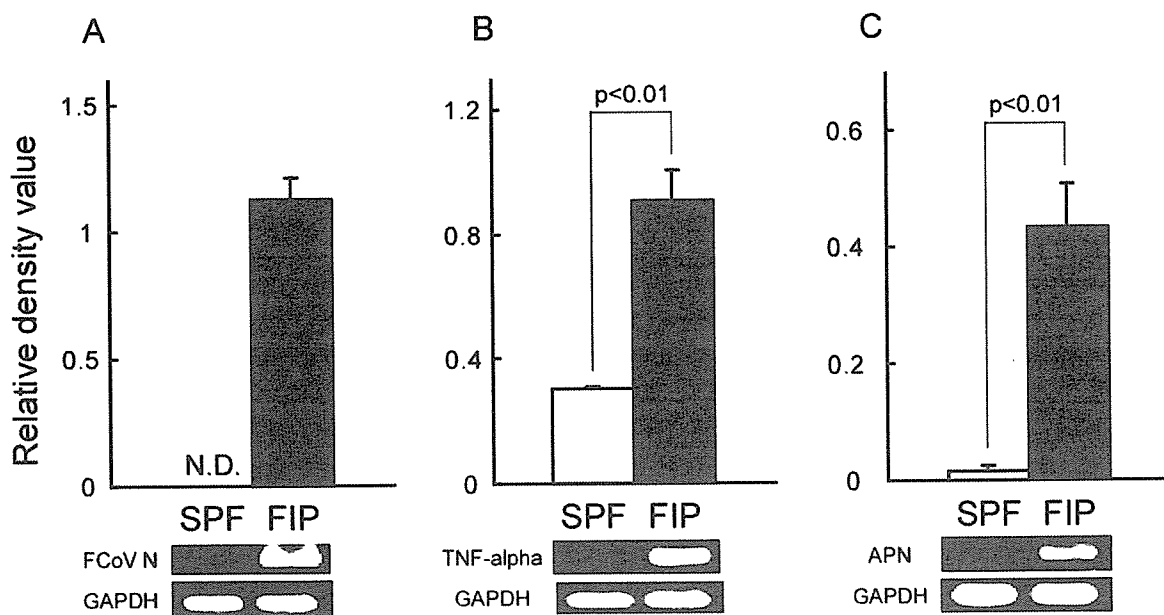


図11 FIP発症猫およびPF猫のマクロファージにおけるFCoV N遺伝子、TNF-αおよびAPN mRNAの発現量。FIP発症猫またはPF猫の肺胞マクロファージ(2×10<sup>6</sup>)を回収しRT-PCRによってFCoV N遺伝子(A)、TNF-α mRNA (B) およびAPN mRNA (C)を検出した。N.D. Not Detected.



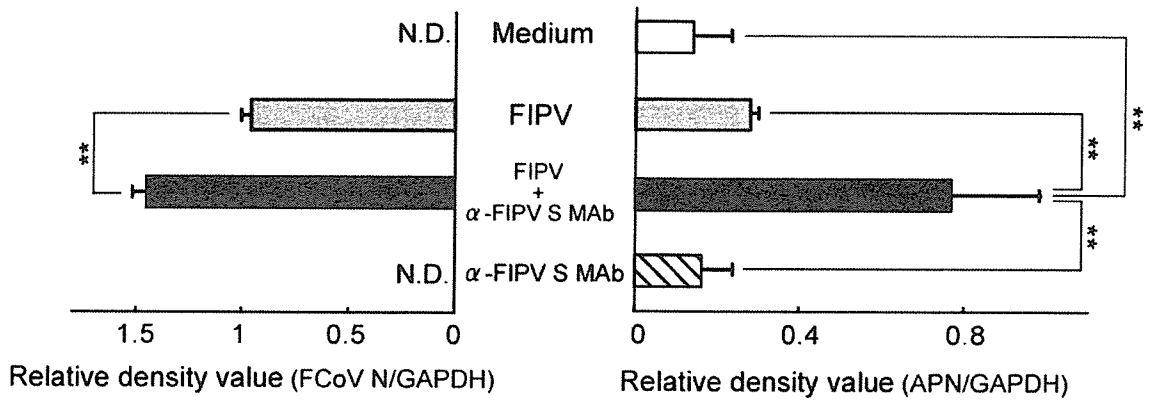


図12 培養猫マクロファージにおける mRNA 発現とFIPV 感染の関係。  
SPF 猫のマクロファージ( $2 \times 10^6$ ) にmedium, FIPV, FIPV+ $\alpha$ -FIPV S MAb、または $\alpha$ -FIPV MAb を接種し3日後に細胞を回収した。その後PCR によってCoV N 遺伝子およびAPN mRNA を検出した。  
\*\*  $p < 0.01$ . N.D. : Not Detected.

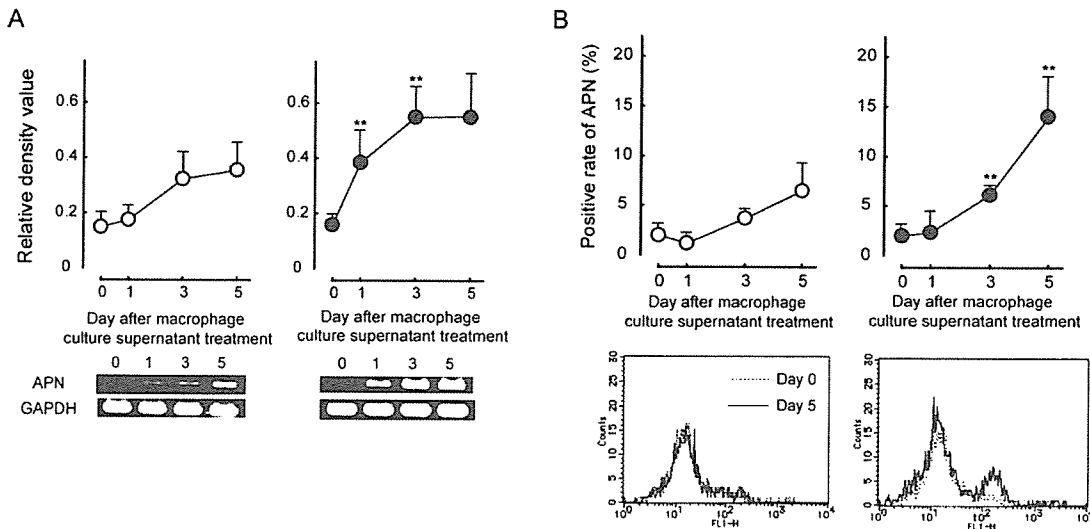


図13 FIPV 感染macrophage培養上清を処理したマクロファージにおけるAPN の発現。  
SPF 猫のマクロファージ( $2 \times 10^6$ ) にFIPV と $\alpha$ -FIPV S MAb の mixtureを接種した3日後にマクロファージ培養上清を回収し56°C、30分間熱処理することによってウイルスを不活化した、その培養上清をmediumでSPF 猫のマクロファージ( $2 \times 10^6$ ) を培養した。培養1,3および5日後に細胞を回収し、細胞内のAPN mRNA発現量(A)または細胞表面のAPN発現量(B)を測定した。○; 対照のマクロファージ培養上清を処理した場合●; FIPV+ $\alpha$ -FIPV S MAb の mixtureを接種したマクロファージ培養上清を処理した場合 \*\*  $p < 0.01$  vs 対照のマクロファージの培養上清を処理した場合

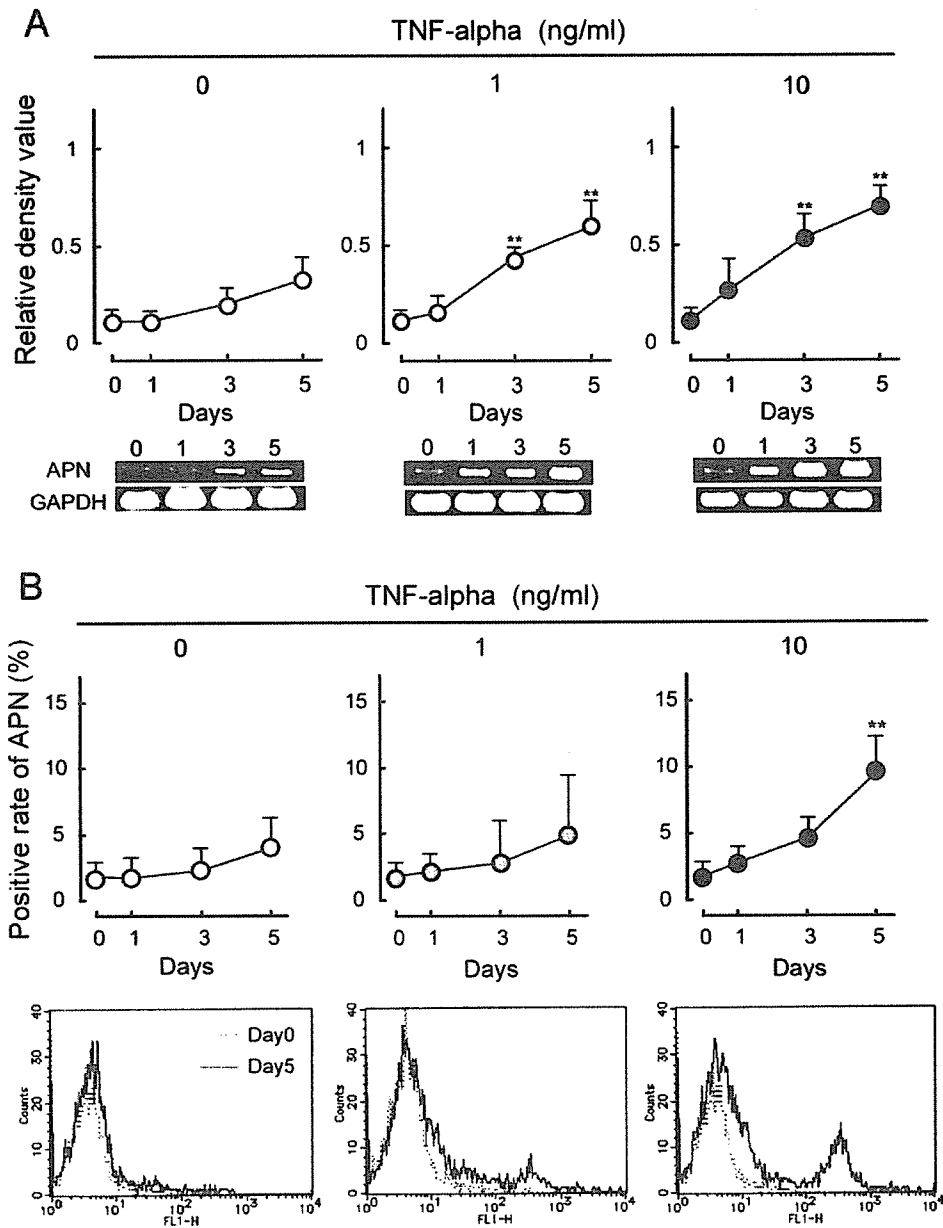


図 14 feline recombinant TNF- $\alpha$  処理マクロファージにおける APN 発現量の変化。

feline recombinant TNF- $\alpha$ を 1 ng/ml あるいは 10 ng/ml 加えた medium で SPF 猫 のマクロファージ ( $2 \times 10^6$ ) を培養した。培養 0, 1, 3 および 5 日後にマクロファージを回収し、細胞内の fAPN mRNA 発現量 (A) または 細胞表面の APN 発現量 (B) を測定した。

\*\*  $p < 0.01$  vs TNF- $\alpha$  0 ng/ml

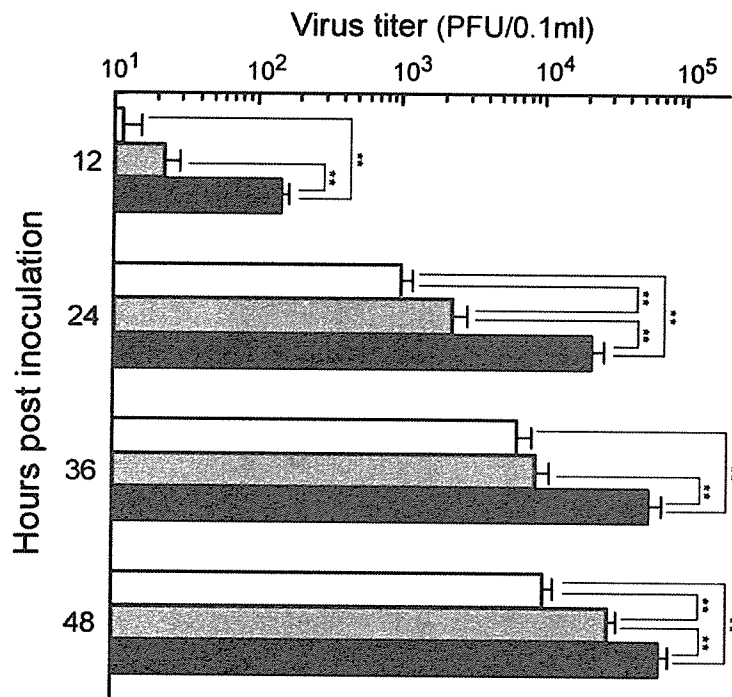


図 15 feline recombinant TNF-alpha 処理マクロファージでの FIPV 増殖。  
 feline recombinant TNF-alpha を 1 ng/ml および 10 ng/ml 加えた medium で SPF 猫  
 のマクロファージ ( $2 \times 10^6$ ) を 5 日間培養した。そして、FIPV を接種し、12 時間お  
 きに 2 日間、培養上清を回収した。その後、培養上清中のウイルス力価を plaque 法で  
 測定した。 \*\* p<0.01

受容体遺伝子導入マウス細胞株を用いた  
豚伝染性胃腸炎ウイルス感染性の解析

分担研究者 池田 秀利 (動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム)  
協力研究者 宮崎 綾子 (動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム)

**研究要旨** ウイルスの宿主指向性や臓器指向性を決める要因の一つは、宿主側のウイルス受容体とウイルス側の受容体結合蛋白との結合性である。本研究ではブタコロナウイルスである豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) およびその S 蛋白遺伝子欠失変異体であり腸管指向性を失った豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) の臓器指向性機構の相違を受容体との相互作用の面から解明することを目的とし、受容体であるブタアミノペプチダーゼ N (pAPN) 遺伝子を TGEV/PRCV 非感受性マウス細胞株に遺伝子導入した pAPN 発現マウス細胞株を樹立、TGEV および PRCV の感染性について解析した。その結果、pAPN 発現マウス細胞株における PRCV 産生力価が TGEV 産生力価に比べ低く、また pAPN 発現マウス細胞株 1 株において PRCV 接種時 M 蛋白合成効率が低下していることが確認された。M 蛋白質はウイルス粒子形成に関与するとされていることから、pAPN 発現マウス細胞株において PRCV の産生ウイルス力価が低い原因のひとつとしてこの M 蛋白質の合成効率の低下が関与している可能性が考えられた。

#### A. 研究目的

動物では様々な動物種固有のコロナウイルスが知られている。SARS コロナウイルスとその他一部のコロナウイルスを除いて、一般的にコロナウイルスの感染する宿主域は狭いとされている。このようなウイルスの宿主指向性や臓器指向性を決める要因の一つは、宿主側のウイルス受容体とウイルス側の受容体結合蛋白との結合性である。

豚のコロナウイルスである豚伝染性胃腸炎ウイルス (Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV) はあらゆる日令のブタに感染するが、特に哺乳豚において激しい下痢を引き起こし高率に死に至らしめることが知られている。また TGEV は腸管だけではなく、呼吸器にも指向性を持っており、特に弱毒化した TGEV で呼吸器指向性を示す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受容体結合蛋白である 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腸管での増殖性を失った豚呼吸器コロナウイルス (Porcine respiratory coronavirus; 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。しかし宿主側ウイルス受容体との相互作用がブタコロナウイルスの臓器指向性にもたらす影響については解明がなされていない。

本研究では TGEV と PRCV の宿主受容体、ブタアミノペプチダーゼ N (pAPN) とこれらウイルスとの相互作用を分子レベルで解析することからブタコロナウイルスの臓器指向性機構を解明することを目的とし、受容体であるブタアミノペプチダーゼ N (pAPN) 遺伝子を TGEV/PRCV 非感受性マウス細胞株に遺