

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19688015

研究課題名 (和文)：猫伝染性腹膜炎ウイルスの感染機序の解明とそれを標的とした抗ウイルス療法の確立

研究課題名 (英文)：Analysis on the mechanism of cell entry of feline infectious peritonitis virus and establishment of new therapeutic strategy.

研究代表者

遠藤 泰之 (ENDO YASUYUKI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：90332600

研究成果の概要 (和文)：

猫伝染性腹膜炎 (FIP) はコロナウイルスである猫電背陰性腹膜炎ウイルス (FIPV) に感染した猫に認められ、現在のところひとたび発症すれば高い致死率を示し、小動物臨床上、非常に大きな問題となっている疾患である。しかし有効な抗ウイルス薬が存在しないこともあり、決定的な治療法は確立されておらず、ステロイド剤の投与を中心とした対症療法が行われているに過ぎないのが現状である。そこで FIPV のレセプターが膜貫通型のエキソ型酵素であるアミノペプチターゼ N (APN) /CD13 であることに着目し、競合拮抗型の APN 阻害剤であるウベニメクスの抗ウイルス増殖抑制効果について検討した。その結果、ウベニメクスは細胞傷害性が無く、また II 型 FIPV に対しては著しい増殖抑制効果を示すことが示された。またウベニメクスを対象動物である猫に投与しても、*in vitro* で FIPV 増殖抑制を示したウベニメクス濃度を維持可能であること、さらに FIPV の増殖抑制効果を期待できる投与量においてウベニメクスが安全であることが示された。さらにウベニメクスが II 型 FIPV にのみ効果を示す可能性も考えられたため、ウイルスの型別に関する疫学調査を行ったところ、これまでの報告と異なり、88%の猫がウイルスを保有しているという結果と共に、II 型の感染率も高いことが明らかにされた。

研究成果の概要 (英文)：

Feline infectious peritonitis (FIP) is caused by FIP virus (FIPV) belonging to coronaviridae. Once FIPV-infected cats develops the disease, it is highly-fatal because of the lack of specific anti-virus drugs and remedy. Therefore, FIP is the one of important infectious disease in small animal practice. A possible cellular receptor of feline coronavirus (FCoV) was identified to be the cell surface aminopeptidase N (APN)/CD13 but not fully understand in type I viruses. The blocking of virus-receptor binding might be a candidate for a therapeutic strategy. We focused on a competitive antagonist of APN, ubenimex, and evaluated its inhibitory effects on FIPV replication. No changes on cell growth and viability were detected in fcwf-4 cells cultivated under culture media containing ubenimex. The replication of the FIPV UCD-1 strain was inhibited on average 20-45% by the addition of ubenimex. However, dose dependency was not observed. On the other hand, the replication of the FIPV 79-1146 strain was significantly inhibited in a ubenimex's dose dependent manner. These results suggested that ubenimex shows potent inhibitory effects on type II FIPV. The toxicity of ubenimex was not detected in cats. In addition, It was possible to obtain blood concentration of ubenimex, which had shown potent inhibitory effect against viral growth *in vitro*, in cats. Because it was suggested that ubenimex would be a causal therapeutic for FIP caused by type II FIPV, an epidemiological survey was carried out to understand the type of harboring virus. This survey clarified high prevalence of FCoV infected cats and type II virus compared to the previous studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 / 臨床獣医学

キーワード：ウイルス・レセプター・治療・猫伝染性腹膜炎

1. 研究開始当初の背景

猫コロナウイルス (Feline coronavirus, FCoV) には感染猫に重篤な臨床症状を伴う猫伝染性腹膜炎 (Feline infectious peritonitis, FIP) を引き起こす FIP ウイルス (FIPV) と、感染してもごく軽度の腸炎しか発症させない猫腸内コロナウイルス (Feline enteric coronavirus, FECV) がある。この FCoV は抗原性の違いにより I 型と II 型に分類されるが、病原性とは関係のないことが示されており、FIPV と FECV のそれぞれに I 型と II 型のウイルスが存在する。したがって FIPV と FECV については、病原性は大きく異なるがそれらの鑑別が血清学的にはできない状況にある。FIP は現在のところひとたび発症すれば高い致死率を示し、小動物臨床、非常に大きな問題となっている疾患である。FIP の病型は、炎症性の胸腹水の貯留を主徴とする滲出型と、各種臓器に肉芽腫性炎を起こす非滲出型の 2 型がある。いずれの病型の発症に関しても免疫学的異常の関与があり、細胞性免疫の誘導が弱いあるいは成立しない場合にウイルス血症となり、滲出型あるいは非滲出型の FIP の発症に至る。つまり中和抗体以外の液性免疫が誘導され、抗原抗体複合体が過剰に産生されると発症するという、自己免疫疾患としての一面を持つ。したがって液性免疫の誘導を主眼としたワクチンによる予防は有効ではなく、さらに高い細胞性免疫活性を誘導するワクチンの開発が困難であるなど、予防についても物理的な感染猫の隔離以外に有効な手段がない。

FIP 発症猫に対する治療は、これまで有効な抗ウイルス薬がないこともあり、現在のところステロイド剤の投与を中心とした対症療法が行われているに過ぎないのが現状である。抗ウイルス薬である Ribavirin が試験管内においてウイルス増殖を抑制することが明らか

にされたが、実際のネコにおいては副作用が見られ、期待される効果は得られなかった。またヒトインターフェロン (IFN) - $\alpha$  の抗ウイルス効果についても検討されたが、こちらも奏効していない。最近になって国内の研究者からトロンボキサン合成阻害剤や猫の IFN- $\omega$  が奏功するとの報告もなされたが、決定的な治療法の確立には未だ至っていない。したがって FIP の根本的な治療法の確立は、小動物臨床の分野において早急に行っていかなければならない事項である。

この問題を解決するために、FCoV のレセプターが C 末端を細胞外領域とする膜貫通型のエキソ型酵素であるアミノペプチターゼ N (Aminopeptidase N, APN) であることに着目し、競合拮抗型の APN 阻害剤であるウベニメクス (あるいはベスタチン) の抗ウイルス増殖抑制効果について検討を行いウベニメクスの治療薬としての可能性を探るとともに、FCoV のレセプター利用の詳細な機序を解明するとともに、レセプターを標的とした積極的な抗ウイルス療法を確立するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、ウベニメクス (あるいはベスタチン) の抗ウイルス増殖抑制効果を確認するとともに、I 型および II 型 FCoV のレセプターの同定とウイルスエンベロープ蛋白とレセプターの結合領域の同定を試み、さらにウベニメクスのネコ APN 上の競合部位の同定、および新規レセプター候補分子が発見された場合にはそのリガンドの検索を実施し、ウイルスレセプターとウイルス蛋白、ならびに結合阻害物質との相互機序を解明する。これらを行った後、実際にウベニメクスならびに新規レセプターの阻害物質による、FCoV 実験感染猫におけるウイルス増殖抑制効果について具

体的な検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

研究開始当初は I 型および II 型 FIPV のレセプターの同定を試みるため、以下の方法により検討を行う予定とした。

I 型および II 型 FIPV の両者に感受性を示す *Felis catus* whole fetus (fcwf-4) 細胞より mRNA を抽出し、これを元に cDNA ライブラリーを作成する。この cDNA を発現ベクターに組み込み FIPV 非感受性細胞に導入し、細胞表面にレセプターを発現させる。

これと並行して I 型 FIPV の UCD-1 株および II 型 FIPV の 79-1146 株のエンベロープ蛋白をコードする遺伝子を単離して発現ベクターに組み込み、I 型および II 型それぞれのエンベロープ蛋白を発現する細胞を得る。次にレセプター蛋白発現細胞と、I 型あるいは II 型 FIPV のエンベロープ蛋白発現細胞を共培養することにより、レセプター蛋白発現細胞とエンベロープ蛋白発現細胞の融合を確認することとした。しかしながら、fcwf-4 細胞の cDNA ライブラリーの作成には成功したものの、それを発現するベクターへの組み込みと FIPV 非感受性細胞への導入、ならびに I 型あるいは II 型 FIPV のエンベロープ蛋白の効率的な発現が得られなかったため、本課題については現在も検討を継続している。

そこで同時にウベニメクスの抗 FIPV 増殖抑制効果を確認し、実際にウベニメクスを治療薬として用いた場合の猫における薬物動態と毒性を評価することとした。まずウイルス増殖抑制効果については、I 型 FIPV である UCD-1 株、II 型 FIPV である 79-1146 株を 0.2~20  $\mu$ g/ml のウベニメクス存在下で同細胞に感染させ、その感染効率の変化を解析した。*In vivo* における薬物動態については、ウベニメクスを 0.5 mg/kg、1 mg/kg、4 mg/kg の用量で猫に単回経口投与し、経時的に採血することによって得られた血清サンプルを用いて、LC-MS/MS 法によりウベニメクス濃度を測定することで解析した。また 2 mg/kg の用量で 60 日間、単回経口投与を行い、一般状態の観察、血液検査、尿検査を実施し、毒性についても評価した。さらに前述のように FCoV には I 型および II 型のウイルスが存在するが、薬剤の効果はこのウイルスの型によっても異なることが予想されるため、実際の猫におけるウイルス保有状況を、ウイルスの型について調査することとした。鹿児島市内の猫 100 頭を対象と、FCoV は主に唾液中や糞便中に排出されることから、試験材料として糞便を使用した。リン酸緩衝液にて 10% 糞便乳剤を作成し RNA 抽出後、FCoV I 型と II 型を識別できるプライマーペアを用いて nested Reverse transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を行い、糞便中の FCoV

の核酸を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) ウベニメクスの *in vitro* におけるウイルス増殖抑制効果

FCoV 感受性細胞である fcwf-4 細胞へのウベニメクスの細胞傷害性について検討したところ、この検討に用いた最大濃度である 20mg/ml の条件下でも細胞傷害性は確認されなかった。次に I 型 FIPV である UCD-1 株、II 型 FIPV である 79-1146 株を 0.2~20mg/ml のウベニメクス存在下で同細胞に感染させ、その感染効率の変化を解析した。ウベニメクスの I 型 FIPV に対する感染抑制効果は弱く、ウイルス感染抑制率は 20.9~46.7% であった。その抑制効果はウベニメクスの濃度に依存しておらず、統計学的な有意差も認められなかった。いっぽう II 型 FIPV に対しては、有意なウイルス増殖抑制効果が認められた。その抑制率は 56.5~88.4% であり、ウベニメクス濃度に依存してウイルス増殖が抑制された。

上記のように、I 型 FIPV と II 型 FIPV に対するウベニメクスの効果が異なることが予想されたため、FIPV と APN との関係について抗ネコ APN モノクローナル抗体を用いてそれぞれのウイルスの増殖抑制について検討した。その結果、抗 APN 抗体存在下において、FIPV 79-1146 株ではその感染と増殖が完全に阻害されたにもかかわらず、FIPV UCD-1 株では、感染と増殖の部分的抑制しか観察されなかった。このことから、II 型 FIPV は APN をウイルスレセプターとして使用していることが強く示唆された。さらにウベニメクスによるウイルス増殖抑制の機序を解明するために、ウベニメクスの *Feline APN (fAPN)* mRNA 発現量に対する影響を検討した。その結果、ウベニメクスを含む培養液で長時間培養すると *fAPN* mRNA 発現量の減少が認められ、このことがウイルス増殖抑制効果のひとつの機序である可能性が示された。

このように、ウベニメクスは細胞傷害性が無く、また II 型 FIPV に関しては著しい増殖抑制効果を示したことから、FIP を発症している猫、あるいは発症する可能性のある猫への応用も可能ではないかと思われた。また今回の結果から、I 型 FIPV が APN をレセプターとしていない可能性が考えられるため、ウベニメクスを実際に応用するためには、猫に感染しているウイルスが I 型あるいは II 型であるのかを血清学および分子生物学的に同定する必要があると思われた。

#### (2) 猫におけるウベニメクスの薬物動態と毒性

(1) の検討でウベニメクスの細胞毒性は極めて低く、ウイルス増殖抑制効果が観察されたことから、ウベニメクスは FIP の発症予防

薬あるいは治療薬となる可能性が示唆された。そこでこれらの成果を臨床応用へ発展させるべく、猫体内におけるウベニメクスの血中濃度の測定、ならびに猫に対するウベニメクスの毒性について検討した。

その結果、1 mg/kg および 4 mg/kg の用量で投与した時に、それぞれ  $4.250 \pm 0.714 \mu\text{g/ml}$  (平均±標準偏差) と  $16.267 \pm 1.914 \mu\text{g/ml}$  の最高血中濃度が得られ、半減期は約 1.5~2 時間であった。このことから *in vitro* でウイルスの増殖抑制を示したウベニメクス濃度を、猫体内でも再現可能であることが明らかになった。

さらに、FIPV の増殖抑制効果を期待できる投与量において、ウベニメクスの猫に対する安全性を確認するため、3 頭の健康猫にウベニメクスを 2 mg/kg の用量で 60 日間、単回経口投与を行い、一般状態の観察、血液検査、尿検査を実施した。その結果、2 頭においては投薬と関連した毒性は認められなかったが、1 頭でアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の上昇が確認された。しかし、ALT は投薬を中止すると速やかに参考基準範囲内の値へと回復したこと、また ALT が高値を示している間もその猫には目立った臨床症状が認められなかったことから、ALT の上昇はそれほど重篤な副作用ではないと考えられた。

このように、ウベニメクスのウイルス増殖抑制効果について検討した基礎的研究結果を受けて行った本研究においては、*in vitro* で FIPV 増殖抑制を示したウベニメクス濃度を血中でも再現可能であること、さらに FIPV の増殖抑制効果を期待できる投与量においてウベニメクスが安全であることが示された。

### (3) 臨床例におけるウイルス保有状況の調査

健康な猫の多くが抗体を保有していることから推測できるように、FCoV は地域に蔓延した風土病と言える。わが国でも以前に青森県内において既に疫学調査がなされており、ウイルス保有猫の多くが I 型に感染していることが分かっているが、FCoV は地域によって株が異なり、感染の動向も異なると思われる。今回は鹿児島市内の猫 100 頭から得られた糞便を材料に RT-PCR 法にて FCoV 由来核酸を検出した。

被検猫の内訳はオス 44 頭、メス 56 頭の計 100 頭で、年齢の中央値は 4 才齢 (平均  $5.5 \pm 5.0$  才齢: 1 ヶ月齢-20 才齢) であった。100 頭中 88 頭が PCR 陽性であり、鹿児島市内での FCoV 蔓延が示唆された。そのうち I 型陽性率は 22%、II 型陽性率は 9%、両者に陽性を示す個体は 57% 存在していた。

本研究中に FIP を発症した猫は見られなかったが、陽性率 88% という数値はこれまでに

報告されている疫学調査例と比較しても高い割合であり、さらに II 型の感染率も高かったことから、ウベニメクスを活用できる機会があるのではないかと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

遠藤泰之「FeLV・FIV・FCoV の性状と診断のポイント」Companion Animal Practice, 227:6-16 (2007) 査読有り.

[学会発表] (計 4 件)

1. Hayashi, M., Yabuki, A., Hohdatsu, T. and Endo, Y. Inhibitory effect of ubenimex on feline infectious peritonitis virus replication *in vitro*. American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Seattle, WA, 2007.

2. 遠藤泰之「猫のウイルス性疾患〜FIV および FCoV 感染症の現状と課題〜」日本臨床獣医学フォーラム九州地区大会、福岡、2007 年

3. 遠藤泰之「特別講演 獣医臨床に分子生物学的技法を取り入れるには 分子生物学的手法が役に立つ感染症の診断」平成 18 年度日本獣医師会学会年次大会、さいたま、2007 年

4. 遠藤泰之「JCVIM 教育講演 猫伝染性腹膜炎の診断と治療法の模索」第 4 回日本獣医内科学アカデミー総会、東京、2007 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 泰之 (ENDO YASUYUKI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：90332600