

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4724112号
(P4724112)

(45) 発行日 平成23年7月13日(2011.7.13)

(24) 登録日 平成23年4月15日(2011.4.15)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A
A 6 1 K	39/125	(2006.01)	A 6 1 K 39/125
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12 1 7 1
G O 1 N	33/569	(2006.01)	G O 1 N 33/569 L

請求項の数 4 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2006-507137 (P2006-507137)	(73) 特許権者	592130699
(86) (22) 出願日	平成16年3月12日 (2004.3.12)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2006-524503 (P2006-524503A)		The Regents of The University of Calif ornia
(43) 公表日	平成18年11月2日 (2006.11.2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トゥエルフス フロ ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/007677		
(87) 国際公開番号	W02004/083390	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成16年9月30日 (2004.9.30)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成18年11月29日 (2006.11.29)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	10/388, 837		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成15年3月14日 (2003.3.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/769, 531		
(32) 優先日	平成16年1月30日 (2004.1.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
微生物の受託番号	ATCC PTA-5797		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病毒性全身性ネコカリシウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された病毒性全身性カリシウイルス (virulent systemic calicivirus) (VS-FCV) であって、

ここで該ウイルスが、ネコにおいて、高熱、浮腫、潰瘍形成、脱毛、鼻および眼の分泌物、食欲不振、抑うつならびに死亡からなる群より選択される症状を伴う伝染性の高い出血熱症候群を引き起こし、

免疫学的有効量のFCV-F9を用いたネコの治療が、VS-FCVによる感染症に対して実質的に防御を与えず、

ここで、前記単離されたVS-FCVが、

(i) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列に対して最適アラインメントを行った場合に、アミノ酸位置394にあるアスパラギンを含むグリコシル化部位；アミノ酸位置448にあるリシン；アミノ酸位置452にあるグルタミン酸；およびアミノ酸位置581にあるリシンまたはアスパラギン酸、を含むキャプシドタンパク質を含むFCV-Kaosウイルス、および

(ii) ATCCアクセッション番号PTA-5797として寄託されているFCV-Ariウイルス、からなる群より選択される、

単離された病毒性全身性カリシウイルス (VS-FCV)。

【請求項 2】

前記VS-FCVがFCV-Kaosである、請求項 1 記載のVS-FCV。

【請求項 3】

10

20

ATCCアクセッション番号PTA-5798として寄託されている、請求項2記載のFCV-Kaos。

【請求項4】

前記VS-FCVがFCV-Ariである、請求項1記載のVS-FCV。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

ネコカリシウイルス（FCV）は、ネコに認められる一般的な病原体である。このウイルスは、保護施設およびネコ飼育所などのネコ多頭飼い環境でしばしば検出される。ネコカリシウイルス（FCV）感染症は、発熱、上気道症状、急性または慢性の口腔疾患、跛行および時には肺炎も含む、さまざまな疾患徴候および症状を引き起こす恐れがある。FCVに対する弱毒化生ウイルスを用いたワクチン接種は広く実施されており、カリシウイルスの多く（すべてではないが）の株によって引き起こされる急性疾患に対してある程度の防御をもたらしている。FCV流行集団内のネコは、感染症の臨床徴候を示すことなく、眼および鼻の分泌物、唾液ならびに糞便中にFCVを放出する。このようなキャリアネコは、他のネコに対する感染症の源としての役割を果たすことがある。しかし、従来、ネコカリシウイルス感染症は通常は致死的ではなく、死亡が起こった場合、それは幼若な子ネコにおける肺炎または重症上気道感染症に起因することが最も多かった。

10

【0002】

FCV感染およびFCV疾患は急性型および慢性型として起こり（Studdert, M.J. (1978) Arch. Virol., 58: 157-191; Reubel et al., (1992) Vet. Clin. No. Am. Small Anim. Pract., 22: 1347-1360）、急性疾患の顕在性徴候はウイルスの経路（例えば、経口、噴霧吸入）および株に依存する。本疾患は重症度の点でさまざまであり、病毒性の強い株は、発熱；抑うつ；呼吸困難；肺炎；ならびに舌、硬口蓋および鼻孔の水疱および潰瘍を引き起こす。病毒性の弱い株が肺を冒す可能性は比較的低いが、他の徴候は同様にみられる。FCVキャリアの大半は無症候性であるが、わずかな割合が慢性形質細胞性もしくはリンパ球性口内炎または慢性潰瘍増殖性口内炎として知られる特徴的な疾患症候群を発症する（Reubel et al. (1992) 前記）。この慢性口腔疾患は進行性で治療困難であり、これはおそらくFCVの既知の臨床症状のうち最も広く認められるものであろう。認知されているFCVの株には明らかな急性死との結びつきはないが、カリシウイルスのゲノムは変異しやすいことが判明している（Johnson, R.P., (1992) Can. J. Vet. Res., 56: 326-330）。このため、より病毒性の強い株が生まれる可能性は常にある。

20

30

【発明の開示】

【0003】

発明の概要

本発明は、伝染性および致死性の高い出血熱症候群を生じさせる新規で非定型的で著しく病毒性の強い型のカリシウイルスである、病毒性全身性ネコカリシウイルス（VS-FCVと称する）によって引き起こされるウイルス感染症に対する免疫処置のためのワクチンおよび方法に関する。

【0004】

本発明の1つの局面は、高熱、浮腫、潰瘍形成、脱毛、鼻および眼の分泌物、食欲不振、抑うつならびに死亡からなる群より選択される症状を伴う、ネコにおける伝染性の高い出血熱症候群を引き起こすウイルスであって、それによる感染症に対してFCV-F9に対する抗血清を用いたネコの治療では実質的に全く防御が得られない、単離された病毒性全身性カリシウイルス（VS-FCV）を提供する。

40

【0005】

本発明のもう1つの局面は、アミノ酸位置448にあるリシン（K）；アミノ酸位置452にあるグルタミン酸（E）；アミノ酸位置581にあるリシン（K）；およびアミノ酸位置581にあるアスパラギン酸（D）からなる群より選択されるアミノ酸残基を含むキャプシドタンパク質を含むウイルスである、単離された病毒性全身性カリシウイルス（VS-FCV）を提供す

50

る。選択的には、本キャプシドタンパク質はアミノ酸位置394にアスパラギン(N)を有し、このアスパラギン(N)はグリコシル化部位を含む。VS-FCVの例には、FCV-Kaos、FCV-AriおよびFCV-Bellinghamなどの株が非制限的に含まれる。

【0006】

本発明のもう1つの局面は、リシン(K)がアミノ酸位置448にあり；グルタミン酸(E)がアミノ酸位置452にあり；かつリシン(K)またはアスパラギン酸(D)がアミノ酸位置581にあるキャプシドタンパク質を含む、単離された病毒性全身性カリシウイルス(VS-FCV)を提供する。選択的には、本キャプシドタンパク質は、グリコシル化部位を含むアスパラギン(N)をアミノ酸残基394に有する。

【0007】

本発明はさらに、病毒性全身性ネコカリシウイルス(VS-FCV)によって引き起こされるウイルス感染症に対する免疫処置のための免疫原性組成物であって、VS-FCVの免疫学的有効量および生理的に許容される担体を含む組成物を提供する。選択的には、本組成物はアジュバントを含む。VS-FCV株は不活化(killed)されていても、弱毒化されていても、または部分的に不活化(partially inactivated)されていてもよい。

【0008】

本発明のさらにもう1つの局面は、病毒性全身性ネコカリシウイルス(VS-FCV)に対してネコの免疫処置を行う方法であって、VS-FCVの免疫学的有効量および生理的に許容される担体を含む組成物の免疫学的有効量をネコに対して投与することを含む方法を提供する。ワクチンは、経口鼻的(oral)に、皮下および筋肉内を非制限的に含む、さまざまな経路によって投与することができる。

【0009】

本発明はまた、生物試料中の病毒性全身性ネコカリシウイルス(VS-FCV)抗体を検出する方法も想定している。本方法は、生物試料をVS-FCVの抗原と接触させること、および免疫複合体の形成を検出することを含む。選択的には、抗原は全ウイルスである。

【0010】

本発明のもう1つの局面は、リシン(K)がアミノ酸位置399にあり；トレオニン(T)がアミノ酸位置430にあり；パリン(V)がアミノ酸位置438にあり；リシン(K)がアミノ酸位置448にあり；グルタミン酸(E)がアミノ酸位置452にあり；アスパラギン酸(D)がアミノ酸位置581にあるキャプシドタンパク質を含む、単離された病毒性全身性カリシウイルス(VS-FCV)であって、アミノ酸位置394のアスパラギンを含むグリコシル化部位をさらに含むVS-FCVを提供する。VS-FCVの例には、FCV-KaosおよびFCV-Ariなどの株が非制限的に含まれる。

【0011】

発明の詳細な説明
定義

「病毒性全身性ネコカリシウイルス」(FCV)とは、ネコにおいて出血熱症候群を生じさせる、非定型的で著しく病毒性が強く伝染性の高い型のネコカリシウイルス(FCV)のことを指す。本発明のVS-FCV株は汎用ワクチン株(例えば、FCV-F9)に対する抗体によっては中和されず、このため、FCV-F9に対する抗血清を用いたネコの処置では、VS-FCVによる感染症に対しては無視しうる程度の防御しか得られない。本発明のVS-FCVは、例えばPedersen et al. Vet. Microbiol. (2000) 73: 281-300に記載されたような標準的なインビトロアッセイにおいて、FCV-F9に対する抗血清がウイルスを中和する能力が相対的に弱いことによって同定される。この目的に適したウイルス中和抗体アッセイについては以下に詳細に述べる。手短かに述べると、FCV-F9によるワクチン接種を受けたネコからの血清の系列希釈物を、検査しようとするFCVの一定量と反応させることにより、ウイルス中和力価を判定する。ウイルス感染性の判定には、Crandellネコ腎細胞(CrFK)に対する細胞変性作用(CPE)を利用する。検出可能なCPEを含む最終希釈度をエンドポイントとして読み取った。致死性全身疾患を引き起こしうる分離株について、抗FCV-F9抗血清の1:16未満の希釈度でCPEがみられれば、そのFCVが本発明のVS-FCVであることの指標となる。

10

20

30

40

50

【0012】

「実質的に防御しない」という用語は、ネコがFCV-F9に対する抗血清またはFCV-F9に対するものと類似した抗血によって治療された場合、それはVS-FCVによる感染症に対する防御免疫を全く付与しないこと、すなわち、ネコは依然としてVS-FCV感染症を定義する1つもしくは複数の症状を呈すると考えられること、またはVS-FCVがそのネコの体内で複製しうることを意味する。

【0013】

「アミノ酸位置」という用語は、本発明のVS-FCV分離株を特徴づけるアミノ酸置換の文脈で用いられる場合、NCBIアクセッション番号M86379.1またはGI:323877であるSEQ ID NO:1のキャプシドタンパク質配列に対する最適アラインメントを行った場合の、キャプシドタンパク質における特定の残基の位置を指して用いられる(Carter et al., Arch. Virol., 122(3-4):223-235 (1992)も参照されたい)。キャプシドアミノ酸配列のアラインメントの一例は図1に示されている。そこに認められるように、SEQ ID NO:1に対する最適アラインメントを行った場合、例示したVS-FCV分離株のそれぞれにおいて、キャプシドタンパク質の位置452にはグルタミン酸(E)が存在する。しかし、FCV-Kaosキャプシドタンパク質(SEQ ID NO:3)は位置442に1アミノ酸残基の欠失を有する。SEQ ID NO:1に対する最適アラインメントを行った場合、FCV-Kaos配列中の位置451に存在するグルタミン酸(E)は位置452に対応し、このため、本発明の目的においては位置452にあるとみなされる。

【0014】

最適アラインメントは一般に、欠失および付加などを考慮に入れて目的検査によって決定される。また、タンパク質配列とSEQ ID NO:1とのアラインメントを、BLASTアルゴリズムをデフォルトのパラメーターで用いて行ってもよい。BLASTアルゴリズムはAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (NCBI)を通じて公開されている。アミノ酸配列に関しては、BLASTPプログラムはデフォルトとしてワード長(W)3、期待値(E)10およびBLOSUM62スコア行列を用いる。

【0015】

「免疫学的有効量」とは、動物個体において検出可能な体液性または細胞性免疫応答を誘導するために十分な免疫原の量のことを指す。

【0016】

「弱毒化」ウイルスとは、宿主に定着することができない、宿主において疾患を引き起こすことができない、または宿主において著しく軽減された疾患症状しか引き起こさない、ウイルスのことを指す。弱毒化ウイルスは一般に、宿主への定着または病原性にかかわる遺伝子成分を欠いている。

【0017】

「防御免疫応答」とは、本明細書で用いる場合、特定病原体によって引き起こされる感染症または疾患を予防または遅延させる細胞性または体液性免疫応答のことを指す。

【0018】

「生物試料」とは、生きた生物体または死んだ生物体から得られる任意の試料のことを指す。生物試料の例には、生物性液体および組織標本が含まれる。組織標本の例には、胎児脳組織、脊髄および胎盤が含まれる。生物性液体の例には、血液、血清、血漿、尿、腹水、脳脊髄液および胎児性液体が含まれる。

【0019】

A) ネコ病毒性全身性カリシウイルスFCV-Kaos

本発明は、伝染性および致死性の高い出血熱症候群を引き起こすFCV-Kaosなどの新規病毒性全身性ネコカリシウイルス(VS-FCV)株に関する。VS-FCVの流行を引き起こす諸ウイルス株は遺伝学的には異なるが、類似した疾患およびワクチン耐性を引き起こす。新規FCV-Kaos株は高密度ネコ集団からの自然突然変異によって生じ、その後、随伴するネコへと直ちに広がる。さらに、FCV-Kaosは通常のFCVワクチン株(例えば、FCV-F9)に対する抗

10

20

30

40

50

体によっては中和されない。このため、ワクチン接種を受けたネコは、この変異株に対して防御されない。この新たな株による死亡率は罹患個体の50%という高さになる。この変異株の発生源は、私的に営まれている保護施設からの子ネコであることがしばしばである。このウイルスは、接触（例えば、ネコとネコ、ヒトとネコ）を介して、顧客が所有している個体へと直ちに広がる。一般的なネコ集団に免疫性を与えるためのワクチンが得られなければ、このウイルスはネコの一般集団（例えば、米国内の70,000,000匹のペットのネコ）に広がって、何十万匹にも及ぶ個体を罹患させる可能性があると予想されている。このため、本発明の1つの目的は、FCV-Kaosによるウイルス感染症を予防するために、現行のカリシウイルスワクチンによって現段階で得られるものよりも幅広い免疫を誘導すると考えられるワクチンを提供することである。FCV-Kaosは、American Type Culture Collectionにアクセッション番号__として寄託されている。

10

【0020】

本発明の1つの態様は、FCV-Kaosによるウイルス感染症に対する免疫処置のための免疫原性組成物であって、ウイルスの免疫学的有効量および生理的担体を含む免疫原性組成物を提供する。選択的には、ワクチンはアジュバントを含む。FCV-Kaos株は生ウイルスでもよく、弱毒化または不活化されていてもよい。

【0021】

FCV-Kaos株の症状には、以下のものが非制限的に含まれる：高熱（すなわち、伝染性および致死性の高い出血熱症候群）；顔面および肢の浮腫（例えば、腫脹）；潰瘍形成（例えば、痂皮形成および局所脱毛）、特に顔面、鼻口部および耳介でのもの；黄疸；肺炎；呼吸困難；DIC（播種性血管内凝固）；重症例における死亡（一部のネコは先行する徴候をほとんど伴わずに死亡することがある）；高ビリルビン血症；高血糖；CPK（クレアチニンホスホキナーゼ）高値；鼻および眼の分泌物；口腔内潰瘍形成；食欲不振；ならびに抑うつ。

20

【0022】

特に、この変異株はネコにおいて出血病様の発熱を引き起こす。ネコはこの高熱を発症し、抑うつ状態となり、しばしば口および鼻の分泌物を生じ、顔面、体幹および下肢に高い頻度で腫脹を起こす。徴候が比較的軽度のネコは数日以内に回復することが時にあるが、徴候が重度のネコは高度の対症療法を行っても死亡することがしばしばである。より詳細には、ネコが呈する状態は多様であり、約50%が顔面および脚に浮腫を有し；90%に発熱があり（106 Fもの高さ）；50%に眼および鼻の分泌物、結膜炎ならびに水疱性または潰瘍性の口内炎といった上気道感染症（URI）の古典的徴候がみられ；20%に黄疸があり；さらに30~40%に鼻および糞便などからの出血がみられる。剖検所見もさまざまであり、これには、80%のネコでの肺硬化および肺炎；50%のネコでの肝腫大；10%のネコでの肺炎；ならびに10%のネコにおける心膜炎が含まれる。

30

【0023】

この株の潜伏期間はほとんどの例で1~5日の間である。しかし、少数の例は、判明している最終曝露時から最長12日後に発症しているように思われる。十分なワクチン接種を受けたネコを含め、すべての年齢のネコがこの株に罹患する。ネコカリシウイルスの他の株と同じく、ネコのかなりの割合は臨床徴候が回復した後もしばらくはウイルスを放出し続ける可能性がある。このため、ネコは早期回復後も依然として他の個体に対する感染性を有する可能性がある。

40

【0024】

VS-FCV株の一例であるFCV-Kaosは全身に存在する可能性があり、糞便ならびに鼻、眼および口の分泌物中に放出されることがある。FCV-Kaoの伝播は容易に起こる。疾患の広がりには、顧客および技術者の病院間の行き来によって助長される。このウイルスは、媒介物（fomite）（すなわち、罹患した発生源からの病原体によって汚染され、感染症を伝達する働きをする任意の物）によっても直接伝播によっても極めて容易に広がりうる。これは、汚染された手、衣類、機器、靴などの表面に少なくとも数時間は保持されうる。このウイルスは感染したネコを取り扱うことによって汚染された衣類に付いて家に運び込まれ、

50

罹患ネコとは直接的には全く接触していないネコに感染症を生じさせる可能性がある（すなわち、ヒトからネコへの伝播）。飛沫伝播は1~2メートルという長い距離でも起こる可能性がある。しかし、FCV-Kaosは粉塵および毛に付いた状態で換気システムを介して運ばれる可能性はあるが、数フィート以上の距離を隔てた空気伝播はこの株では通常みられない。この疾患が感染症であるという認識はしばしば遅れるが、これは、疾患が最初に広がった病院では症例は認められず、その後、所有者が一方の病院で感染したネコをもう一方の病院に持って行った時に他の病院への広がりが起こるためである。このため、媒介物伝播の予防のために慎重に注意を払うことが、FCV-Kaosの広がりを予防するためには重要である。VS-FCVは乾燥状態にある室温（20℃）の環境で最長28日にわたって持続しうる。このことは、感染の見かけ上の遅発性伝播に役割を果たしている可能性がある。

10

【0025】

FCV-AriおよびFCV-KaosなどのVS-FCV株は、保護施設およびネコ飼育所などのネコ多頭飼育環境で発生することが最も多い。持続感染した母親から生まれた子ネコは、成体ネコと比べて、自らは臨床徴候をほとんど示さずに病毒性VS-FCVを放出する可能性がある。このため、子ネコはVS-FCVの伝播に役割を果たす可能性がある。多くの保護施設および救援グループに共通する、子ネコの割合の高さ、集団回転率の高さ、および冒されやすい動物が定常的に入ってくることにより、高度のウイルス複製、宿主乗り換え、ウイルスの広がり、複製および変異が起こる可能性がさらに高くなる。一般に、疾患が広がる方法は、VS-FCVの防除法に対しても意味を有する。特に、軽症の罹患動物は疾患の伝播に重要な役割を果たす可能性がある（例えば、見かけ上は健康そうなネコが家に放たれ、その後間もなくしてその同腹子が致死性疾患を発症する）。

20

【0026】

どの年齢のネコもFCV-Kaosに対する感受性があるが、重症疾患および死亡に関しては成体の方が子ネコよりもリスクが著しく高い。これは免疫系の応答が疾患の重症度と相関している場合にはしばしばあることである。よくあることであるが、ワクチン接種を受けたネコ（例えば、FCV-F9）は、FCV-Kaosに感染して重症疾患および死亡を被る恐れがある。VS-FCVの諸株は一般にワクチン耐性である。FCVの出血性株の原因となる変異は、ワクチン耐性を付与する抗原構造の変化と結びついている可能性がある。曝露されたネコのウイルス培養、cDNAシーケンシングおよび血清学的検査により、軽症および潜伏期の感染症を含む、VS-FCV疾患の広範囲にわたる臨床症状を認識することが可能となる。口咽頭スワブ試料からの培養およびPCRによるウイルス単離は、試料を急性感染時および剖検時に採取した場合には疾患の高感度な診断法である。陽性培養物は、曝露後間もない無症候性ネコからも得ることができる。ウイルス単離の感度は疾患の後期にはかなり低くなるため、一つのスワブ試料が陰性であっても低レベルの排泄の可能性を否定することはできない。血清学的検査は曝露歴を確かめるために有用であり、流行時に得られたいずれかの試料に基づき、通常は高感度および特異的である。

30

【0027】

FCV-Kaosの分離株には互いに高度の類似性があるが、Pedersen et al. *Vet. Microbiol.* (2000) 73: 281-300に記載されたようにcDNAシーケンシングによって特徴が明らかにされたもう1つのVS-FCV株であるFCV-Ariとは高度の類似性はない。このことは、VS-FCV疾患の原因となる変異がそれぞれの場合で異なることを示すように思われる。FCVは臨床的に健康なネコおよびURIを有するネコの口腔から高い頻度で単離されるため、血管炎の徴候を有するネコからのウイルス培養またはPCRが陽性であっても、複数の罹患ネコにおける特異な株の存在を示すcDNAの裏づけがなければ、VS-FCV疾患と診断されたとみなすべきではない。

40

【0028】

他のFCV株でよくみられるように、FCV-Kaos感染後に生き延びた一部のネコは慢性キャリアとなる可能性がある。例えば、FCV-Ariに感染したネコは感染後最長10週間にわたって培養上陽性であることが知られている。また、FCV-Kaosの放出も一部のネコでは少なくとも16週にわたって持続する可能性がある。このため、慢性キャリアは、臨床徴候の回復

50

から長時間を経た後にもVS-FCV株を他のネコに渡すことができる。年齢、健康状態またはワクチン接種の状態にかかわらず、FCV-Kaos感染に対しては幅広い感受性が存在する。病毒性の強い感染症は疾患が広がるよりも早くその宿主を死滅させる可能性はあるものの、本明細書に記載した流行（実施例の項を参照）では少なくとも32匹のネコが生存しており、その一部は病毒性FCV-Kaosと識別不能なウイルスを放出し続けた。このウイルスが流行初期に認められるものと同じ病毒性および広がりやすさを保つならば、この感染ネコの貯蔵所となる可能性のあるものから、さらなる流行が生じると考えられる。VS-FCVを生じさせた変異は継代過程でより病毒性の弱いまたは強い株へと復帰する可能性があり、持続感染ネコではバリエーション株が発生する。このため、FCV-Kaos感染症はネコ集団に対して大きなリスクをもたらすものであり、疾患のさらに深刻な流行および広がりを招く可能性もある。

10

【0029】

B) ネコ病毒性全身性カリシウイルスFCV-Ari

本発明はまた、非定型的で伝染性の高いFCVである、FCV-Ariなどの新規な病毒性全身性ネコカリシウイルス（VS-FCV）株にも関する。ネコにおけるFCV-Ari感染症は、最も重症の形態では、FCV-Kaos感染症で認められるものに類似した全身性の出血病様発熱を呈する。この新たな分離株FCV-Ariは、汎用的なFCV-F9ワクチン株に対する抗血清により、無視しうる力価および低力価へと中和することができる。汎用FCV-F9による免疫処置を受け、その少し後にFCV-Ariの曝露負荷を受けたネコは、幾分軽症化した限定的な経過をたどる型の疾患を発症し、このことはFCV-Kaosと対比してわずかな部分的防御が得られることを示している（前記）。しかし、汎用FCV-F9ワクチン株に対する抗体はFCV-Ariとは明らかな交差反応はせず、FCV-F9による免疫処置はネコに対してごくわずかな程度の免疫性しか付与しない。過去にワクチン接種（すなわち、非経口のFCV-F9ワクチンによる免疫処置）を受けたネコの大部分は、FCV-Ariに対する曝露から間もなく死亡する。

20

【0030】

FCV-Ariによって引き起こされる疾患は、皮下組織および肺における高度の浮腫（時には出血）ならびに皮膚および脂肪組織の局所壊死からも示されるように、血管を標的とするように思われる。血管の健全性の喪失は、血清タンパク質の顕著な低下、黄疸性血清（遊出した赤血球の崩壊による）、種々の程度の血小板減少症および凝固障害と関係する。CPK上昇もみられ、これは筋壊死を意味する。一般に、この疾患の特徴には、死亡率の高さ、高齢個体でより重症な疾患が引き起こされる傾向、広がりやすさ、急性型であること、肝細胞指向性、および広範囲に及ぶ血管疾患が含まれる。感染が死を迎えたネコにも継続している可能性があること、すなわち、このウイルスが臨終時点のネコの血中にも依然として存在することには注目すべきである。FCV-Ariは病毒性の強い株であり、高齢個体に対する障害性が最も高い。しかし、内在性の耐性因子が何らかの役割を果たしている可能性もある。より軽症で限定的な経過をたどる疾患を発症するネコもあれば、感染によって廃疾状態となるネコもある。FCV-Ari、症状および疾患の詳細はPedersen et al., Vet. Microbiol. (2000) 73: 281-300に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。FCV-AriはAmerican Type Culture Collectionにアクセッション番号__として寄託されている。

30

40

【0031】

本発明の1つの態様は、FCV-Ariによるウイルス感染症に対する免疫処置のための免疫原性組成物であって、ウイルスの免疫学的有効量および生理的担体を含む免疫原性組成物を提供する。選択的には、ワクチンはアジュバントを含む。FCV-Ari株は生ウイルスでもよく、弱毒化または不活化されていてもよい。

【0032】

本発明のもう1つの態様は、FCV-Ariを含まないVS-FCVによるウイルス感染症に対する免疫処置のための免疫原性組成物であって、ウイルスの免疫学的有効量および生理的担体を含む免疫原性組成物を提供する。選択的には、ワクチンはアジュバントを含む。FCV-Ari株は生ウイルスでもよく、弱毒化または不活化されていてもよい。

50

【0033】

C) 免疫原性組成物

本発明の1つの局面は、FCV-Kaos、FCV-AriまたはFCV-BellinghamなどのVS-FCV株に対してネコの免疫処置を行う方法であって、ネコに対して本発明の免疫原性組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本発明の1つの好ましい態様においては、弱毒化または不活化したFCV-Kaosウイルスを、当技術分野で知られた種々の溶液および他の化合物と配合または混合する。本発明のもう1つの好ましい態様においては、弱毒化または不活化したFCV-Ariウイルスを、当技術分野で知られた種々の溶液および他の化合物と配合または混合する。本発明のさらにもう1つの好ましい態様においては、弱毒化または不活化したFCV-Bellinghamウイルスを、当技術分野で知られた種々の溶液および他の化合物と配合または混合する。免疫原性組成物は、注射剤として、溶液として、または乳剤として調製することができる。本発明のウイルス株を、薬学的に許容される添加剤と混合してもよい。添加剤には、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールおよびそれらの配合物が含まれる。ワクチンがさらに、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤などの補助物質、またはワクチンの有効性を高めるためのアジュバントを含んでもよい。

10

【0034】

本発明の免疫原性組成物は、全ウイルスおよび/またはウイルス感染細胞株を含みうる。ウイルスを完全または部分的に不活化して、組成物中の免疫原として利用することもできる。部分的な不活化は、高温での継代によって、または紫外光、エチルメタンスルホネートなどの変異原との接触によって実現しうる。完全な不活化は、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、フェノール、 γ -ラクトプロピオン酸、紫外光、熱、ソラレン、白金錯体、オゾンおよびその他の殺ウイルス剤を含む、その他の作用因子との接触によって実現しうる。

20

【0035】

全ウイルスに加えて、ウイルスタンパク質またはペプチドを、周知の技法によって調製されるサブユニットワクチンの調製に用いることもできる。有効な免疫防御を誘発させるためには、哺乳動物を適切なエピトープに対して曝露させることのみが必要であることを当業者は直ちに理解すると考えられる。エピトープは一般に、全タンパク質のうちのセグメントである。したがって、弱毒化または不活化された全ウイルス体の代わりに単離されたタンパク質またはポリペプチドを免疫原として含む、本発明の免疫原性組成物を調製することが可能である。当業者は、このような免疫原を組換え法を用いて調製しうることを認識しているであろう。また、天然に存在するエピトープと同一または実質的に同じ（免疫学的に等価）であるエピトープを含む誘導体を作り出すために、天然タンパク質の一次構造を改変することもルーチン的手順である。このような誘導体には、選択した標的タンパク質の天然のアミノ酸配列の内部の、ペプチド断片、アミノ酸置換物、アミノ酸欠失物およびアミノ酸付加物が含まれる。例えば、タンパク質の技術分野では、タンパク質の生物活性に過度の影響を及ぼすことなく、特定のアミノ酸残基を、サイズおよび極性が類似しているアミノ酸と置換しうるということが知られている。

30

【0036】

防御免疫応答を誘発しうる抗原領域を提示するポリペプチドを選択し、適切な担体中に組み入れる。または、1つまたは複数のウイルスタンパク質の免疫原性部分を、融合タンパク質の発現によってより大規模なタンパク質中に組み入れることもできる。他のウイルスに関するサブユニットワクチンの調製は周知であり、Lerner et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3403およびBhatanagar et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4400を含む、さまざまな参考文献に記載されている。また、米国特許第4,565,697号（天然物由来のウイルスタンパク質をワクチン組成物に組み入れている）；第4,528,217号および第4,575,495号（ウイルスタンパク質の一部を形成する合成ペプチドをワクチン組成物に組み入れている）も参照されたい。ウイルスタンパク質の一部のみを用いてワクチンを形成するためのその他の方法は、米国特許第4,552,757号；第4,552,758号；および第4,593,002号に記載されている。

40

50

【0037】

上記のようにして調製されたワクチンは、経口鼻的、皮下、腹腔内または筋肉内を含む、任意の従来の様式で投与しうる（ただし例外として、経口鼻的投与は部分不活化ウイルスワクチンには通常用いられない）。アジュバントも、完全不活化ワクチンの皮下注射および筋肉内注射の際に免疫応答を増強するために役立つと考えられる。アジュバントを任意に用いるウイルスワクチン組成物の調製は、「レミントン薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、Mack Publishing Co., Easton, Pa., 16th ed., 1982などの数多くの標準的な参考文献に記載されている。

【0038】

本発明の組成物の剤形および免疫原含有量は、免疫原の性質（すなわち、全ウイルス、感染細胞またはサブユニット）および投与経路に応じて異なると考えられる。通常、1回量は、担体、アジュバントおよび任意の他の成分を含め、約0.1ml～約5ml、より一般的には約0.5ml、より一般的には約0.5ml～約3mlの範囲にある全容積を有すると考えられる。各用量における不活化または弱毒化された全ウイルスの量は通常、約0.1mg～約5mg、通常は約0.2mg～2mgの範囲にあると考えられる（不活化ウイルスに感染させた細胞系の場合には、各用量は一般的には約 10^6 ～ 10^8 個の細胞、通常は約 5×10^6 ～ 5×10^7 個の細胞を含みうる）。

【0039】

接種の回数および時期は、VS-FCV（例えば、FCV-Kaos、FCV-Ari、FCV-Bellingham）によるその後の感染攻撃に対して所望の免疫防御応答を誘発するのに十分であると考えられる。通常は、少なくとも2回の接種が少なくとも1週間の間隔で行われ、より一般的には2回～10回の接種が2～30週にわたって行われると考えられる。しばしば、最後の接種は初期の一連の投与後にある程度より長い間隔をおいて行われることがある。特定のワクチン製剤に関する最適な投与パターンの選択は、当技術分野の技能の範囲に十分に含まれる。

【0040】

本発明の組成物は経口鼻的送達用に製剤化することができる。担体が固体である、鼻内投与のために適合化された薬学的組成物には、粒径が例えば約10～500ミクロンの範囲にあって、鼻から吸入する様式で、すなわち鼻の近くに保持した粉末容器からの鼻腔を介した急速吸入によって投与される粗末が含まれる。担体が液体である、スプレー式点鼻薬もしくは点鼻薬として、またはネブライザーによるエアロゾル投与による投与のために適した組成物には、有効成分の水溶液または油性溶液が含まれる。この種の投与のさまざまな手法は当技術分野で周知である。鼻投与用の医薬製剤は、ベンジルアルコールまたはその他の適した保存料、生物学的利用能を高めるための吸収促進剤、フルオロカーボン、および/または当技術分野で知られたその他の可溶化剤または分散剤を用いて、食塩水中にある溶液として調製することができる。鼻投与のための単位用量は、単位剤形当たり1～3000mg、例えば、10～1000mgまたは1～10mgの有効成分でありうる。

【0041】

本発明のワクチンを、多価ワクチンを製造するために、同じ疾患または他の疾患のための他のワクチンと配合することもできる。免疫原の薬学的有効量を、哺乳動物、特にネコのワクチン接種のために有用な、タンパク質または希釈剤などの薬学的に許容される担体とともに用いることができる。その他のワクチンを当業者に周知の方法に従って製造することもできる。

【0042】

弱毒化または不活化されたFCV KaosまたはFCV-Ariとともに配合しうるその他のワクチン（その他のネコワクチンを含む）の例には、ネコ汎白血球減少症ウイルス抗原、ネコヘルペスウイルスI抗原、白血病ウイルス抗原および狂犬病抗原が非制限的に含まれる。

【0043】

D) VS-FCVを検出するためのアッセイ

本発明のVS-FCVウイルス株（例えば、FCV-Kaos、FCV-Ari、FCV-Bellingham）およびそれらと特異的に結合する抗体は、よく知られた数多くの免疫学的結合アッセイのうち任意

10

20

30

40

50

のものを用いて検出および/または定量化することができる。一般的なイムノアッセイの総説については、「細胞生物学における方法：細胞生物学における抗体 (Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology)」、volume 37 (Asai, ed. 1993) ; 「基礎および臨床免疫学 (Basic and Clinical Immunology)」（Stites & Terr, eds., 7th ed. 1991）も参照されたい。免疫学的結合アッセイ（またはイムノアッセイ）では一般に、選択したタンパク質または抗原と特異的に結合する抗体を用いる。抗体は、当業者に周知の数多くの手段および上記の手段の任意のものによって作製しうる。または、選択したタンパク質または抗原を、感染動物の血清中の抗体と結合させるために用いることもできる。タンパク質または抗原は、当業者に周知の数多くの手段および上記の手段の任意のものによって作製しうる。

10

【0044】

イムノアッセイでは、抗体および抗原によって形成された複合体と特異的に結合してそれを標識化する標識剤もしばしば用いられる。標識剤はそれ自体が抗体/抗原複合体を含む部分の1つであってもよい。すなわち、標識剤が標識された抗原または標識された抗体であってもよい。または、標識剤が、抗体/抗原複合体と特異的に結合する二次抗体などの第3の部分であってもよい（二次抗体は一般に、一次抗体の由来である種の抗体に対して特異的である）。特異的に結合免疫グロブリンの定常領域と特異的に結合しうるその他のタンパク質、例えばプロテインAまたはプロテインGなどを標識剤として用いることもできる。これらのタンパク質は、さまざまな種由来の免疫グロブリン定常領域に対して強い非免疫原性反応性を示す（例えば、Kronval et al., J. Immunol. 111: 1401-1406 (1973) ; Akerstrom et al., J. Immunol. 135: 2589-2542 (1985)を参照）。別の分子、例えばストレプトアビジンが特異的に結合しうる、ビオチンなどの検出可能な部分によって標識剤を修飾することができる。ストレプトアビジンは以下に考察するような標識または検出可能基と結合しうる。当業者にはさまざまな検出可能部分が周知である。

20

【0045】

アッセイに用いる個々の標識または検出可能基は、アッセイに用いる抗体の特異的結合にそれが大きな妨げとならない限り、本発明の特に重要な局面ではない。検出可能基は、検出可能な物理的または化学的特性を有する任意の物質でありうる。このような検出可能な標識はイムノアッセイの分野では十分に開発されており、通常、このような方法に有用なほとんどすべての標識を本発明に適用することができる。すなわち、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電子的、工学的または化学的な手段によって検出可能な任意の組成物である。本発明において有用な標識には、磁気ビーズ（例えば、DYNABE ADS（登録商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど）、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびELISAに一般に用いられる他のもの）、およびコロイド金または着色ガラスまたはプラスチックビーズ（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）などの比色定量標識が含まれる。

30

【0046】

標識を検出する手段は当業者に周知である。すなわち、例えば、標識が放射性標識であれば、検出のための手段には、シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィの場合の写真フィルムが含まれる。標識が蛍光標識であれば、適切な波長の光で蛍光色素を励起させ、その結果生じた蛍光を検出することによってそれを検出しうる。蛍光は、肉眼的に、写真フィルムにより、電荷結合素子 (CCD) または光電子増倍管などの電子検出装置の使用によって検出しうる。同様に、酵素標識は、酵素に対する適切な基質を提供し、その結果得られた反応生成物を検出することにより検出することができる。さらに、単純な比色定量標識は、標識に伴う色を単に観察することによって検出しうる。すなわち、種々の試験紙アッセイにおいて、結合した金はしばしば薄赤色に見え、一方、種々の結合ビーズはビーズの色に見える。

40

【0047】

50

さまざまなアッセイ形式が周知である。アッセイは競合アッセイでも非競合アッセイでもありうる。典型的なアッセイはELISA形式で行われると考えられる。試料中のウイルス抗原の存在を検出および定量化するためには、ウエスタンブロット（イムノブロット）分析を用いることができる。その他のアッセイ形式には、特定の分子（例えば、抗体）と結合し、封入された試薬またはマーカを放出するように設計されたリポソームを用いるリポソームイムノアッセイ（LIA）が含まれる。続いて、放出された化学物質を標準的な技法に従って検出する（Monroeら、Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41（1986）を参照）。

【0048】

当業者は、イムノアッセイでは非特異的結合をできるだけ減らすことが往々にして望ましいことを理解すると考えられる。特に、固体基質上に固定された抗原または抗体をアッセイに用いる場合には、基質に対する非特異的結合の量をできるだけ減らすことが望ましい。このような非特異的結合を減らす手段は当業者には周知である。この技法には一般に、基質をタンパク質組成物でコーティングすることが含まれる。特に、ウシ血清アルブミン（BSA）、脱脂粉乳およびゼラチンなどのタンパク質組成物が広く用いられ、中でも脱脂粉乳が最も好ましい。

【0049】

VS-FCV-KaosのDNAおよびRNAが試料中に存在することを検出するために核酸ベースのアッセイを用いることもできる。この種のアッセイには、サザン分析、ノーザン分析、ドットブロット法、RNアーゼ保護、S1分析、PCRおよびLCRなどの増幅法、ならびにインサイチュハイブリダイゼーションといった、当業者に知られた数多くの技法が含まれる。例えば、インサイチュハイブリダイゼーションでは、細胞内でのハイブリダイゼーションが可能になると同時にその後の解釈および分析のために細胞形態が保持されるように、標的核酸をその細胞周囲から遊離させる。

【0050】

E) 実施例

以下の具体例は本発明を例示することを意図しており、特許請求の範囲を限定するものとみなされるべきではない。

【0051】

実施例1：データ収集

ネコにおけるFCV-Kaosの流行は、2002年の6月および7月にLos Angeles, CA地区の3つの獣医学診療施設で起こった。出血病様の症候群が観察され、罹患ネコは、より一般的に観察されるカリシウイルス呼吸器感染症の徴候に加えて、血管炎、顔面および肢の浮腫ならびに多臓器への影響の徴候を呈した。合計54症例が文書として記録された。総死亡率は40%であり、成体ネコ（>6カ月）における死亡率は59%であった。成体ネコの方が子ネコよりも重症疾患または死亡を起こす確率が高かった（オッズ比9.56、CI 2.82-32.39、 $p < .001$ ）。発病率（attack proportion）は94%であった。症例のうち21%は軽症または潜伏性であった。罹患ネコの多くはネコカリシウイルスに対するワクチン接種を受けていたが、ワクチン株FCV-F9に対する抗体はFCV-Kaosを中和しなかった。実際、罹患ネコの少なくとも26匹（48%）はネコヘルペスウイルス、カリシウイルスおよびネコ汎白血球減少症ウイルスに対するワクチン接種歴があった。FCV-Kaosの広がり、媒介物、および感染ネコの移動を介して、病院および家庭の内部および相互間で容易に起こった。実施例1~8（以下参照）は、FCV-Kaosの流行、症状、疾患、病理学および分析に関する詳細な記載を提供している。実施例9（以下参照）は、同程度に病毒性および伝染性の高い株であるFCV-Ariの以前の流行について記載している。

【0052】

FCV-Kaos症例に関する情報は、直接面談および電話による問診、ならびに診療録の検討によって収集した。3つの獣医学診療施設および1つの救援グループでFCV-Kaos株の罹患がみられた。罹患がみられた各診療施設を訪問し、疑われる症例のすべての入手可能な記録を吟味した。感染症の徴候を呈するか否かにかかわらず、流行期間中に入院動物として入院したすべてのネコに関する情報を収集した。流行時点で救援グループの里親保護ネット

10

20

30

40

50

ワークに存在したすべてのネコに関する文書化された概要を、救援グループのスタッフから提供してもらった。

【0053】

実施例2：症例の定義

FCV-Kaos症例を、確定例、疑診例または可能性例として分類した。

【0054】

「確定」例は、以下のいずれかとして定義した：

- (a) FCV-Kaosの単離および遺伝子シーケンシングがなされたネコ。
- (b) 遺伝子シーケンシングによって確定された症例との接触があり、他の原因では説明が付かない突然死または顔面もしくは肢の浮腫を呈し、そのほかにカリシウイルス感染症の1つまたは複数の徴候（例えば、発熱、口腔潰瘍、眼または鼻の分泌物、跛行）を有するネコ。

10

【0055】

「疑診」例は、以下のいずれかとして定義した：

- (a) 確定例との接触があり、突然死または顔面もしくは肢の浮腫もしくはただれ/脱毛/潰瘍形成がカリシウイルス感染症の他の徴候とともに報告されているが、獣医によって確定されていないか、他の原因が除外されていないネコ。
- (b) 確定例との接触があり、FCV-Kaosに対して血清陽性であるが、異常な臨床徴候が報告されていないネコ。

20

【0056】

「可能性」例は以下の通りに定義した：

確定例との接触があり、発熱が報告されていて、上気道感染症（例えば、口腔潰瘍、眼または鼻の分泌物、食欲不振）の他の徴候を有するが、浮腫および死亡はなく、ウイルス培養も血清学的検査も行われていないネコ。

【0057】

実施例3：臨床徴候および病理検査

発熱はネコで最も高頻度に報告された臨床症状であり、44例/54例でみられた（81%）。体温の中央値は40.6（105.1° F）であり、39.4 ~ 42.4（103.0° F ~ 106.5° F）の範囲であった。肢および/または顔面の浮腫は症例の28例/54例（52%）で報告された（肢の浮腫は25例で報告され；顔面浮腫は14例で報告された）。報告されたその他の異常は、頻度の高い順に以下の通りであった：口腔潰瘍（25例/54例、46%）；鼻の分泌物（16例/54例、30%）；呼吸困難（9例/54例、17%）；顔面、耳介または肢のただれ、痂皮形成または脱毛（9例/54例、17%）；眼分泌物/結膜炎（6例/54例、11%）；臨床的に明らかな黄疸（6例/54例、11%）；胸水（5例/54例、9%）；下痢（4例/54例、7%）；嘔吐（4例/54例、7%）；および跛行（3例/54例、6%）。出血熱には血管炎および明白な出血に特徴的な徴候を含めた。明白な出血は2症例で観察された（1例は鼻から、もう1例は鼻および直腸から）。

30

【0058】

疾患の重症度は、徴候が全くないものから致死性疾患までの範囲にわたった。感染したと判断されたうち（ウイルス培養およびシーケンシングの結果が陽性であることに基づく）、3例/54例（6%）には全く異常が認められなかった。8例/54例（15%）では、口腔潰瘍、鼻/眼の分泌物および104° F未満の発熱に限定される軽度の徴候のみが観察された。中等度の徴候は8例/54例（11%）で報告され、これには104° Fを上回る発熱、1日よりも長期にわたる傾眠/食欲不振、皮膚のただれ/痂皮形成/膿胞、眼/鼻の分泌物および/または口腔潰瘍が含まれた。浮腫、呼吸窮迫および/または死亡を含む重度の徴候は35例/54例（65%）で報告された；重度の徴候がみられた35匹のネコのうち13匹は生き延びた。

40

【0059】

17症例では最初に曝露した日が確定された。これらの症例のうち、曝露から徴候が最初に認められた日までの期間の中央値は4日であり、範囲は1~12日であった。見かけ上の潜

50

伏期が長いケースは、家庭内で別の罹患ネコにより二次的に曝露されたネコの場合にみられた。入院中に曝露されたネコの場合、曝露と徴候観察時との間に認められた最長の期間は5日であった。1匹の雄ネコでは、曝露が推定される時点から34日後になって徴候が生じた。この雄ネコは、症状発現の2～15日前に2回目の曝露を受けた可能性がある。

【0060】

10症例に対しては一連の血液化学検査値が得られた。血液化学検査での異常所見には、以下のものが含まれた：6例/10例における高ビリルビン血症（0.6～3.9mg/dlの範囲、基準範囲＝0.1～0.4mg/dl）；5例/10例における低アルブミン血症（1.1～2.1g/dlの範囲、基準範囲＝2.5～3.9g/dl）；3例/10例におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の上昇（103～223IU/Lの範囲、基準範囲＝10～100IU/L）；2例/10例におけるアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の軽度上昇（102-116IU/Lの範囲、基準範囲＝10～100IU/L）；および5例/10例におけるクレアチンホスホキナーゼ（CPK）の上昇（639～10930IU/L、基準範囲＝56～529IU/L）。

【0061】

全血算値は8例に関して得られた。3例/8例には軽度の好中球増加がみられ（8549-11616個/μlの範囲、基準範囲＝2500～8500個/μl）、5例/8例には軽度ないし中等度のリンパ球減少症がみられた（180～1188個/μlの範囲、基準範囲＝1200～8000個/μl）。ヘマトクリット値は2例/8例で幾分低下していた（25%、基準範囲＝29～48%）。

【0062】

肉眼的な剖検の結果は5匹のネコに関して得られた。いずれのネコにも、鮮黄色の皮下浮腫が大量に存在し、これは顔面および肢で最も顕著であった。2匹のネコでは就下性浮腫が胸壁に沿って拡がり、鼠径部領域および体軸領域の全体に及んでいた。結膜は赤く腫脹しており、痂皮性物質が内眼角に付着していた。潰瘍はどのネコにも存在したが、部位および程度はさまざまであった。3匹のネコでは、肉球と有毛皮膚との間の接合部に全周性潰瘍形成がみられた。2匹のネコには、背側、外側および腹側の舌表面に直径0.4cmの融合性潰瘍があった。2症例では、舌には影響は認められなかったが、鼻孔中隔および鼻を覆う有毛皮膚に潰瘍形成がみられた。いずれのネコにも最大100mlの淡紅色で幾分不透明な液体が腹腔および胸腔に存在し、1匹のネコでは同じような性状の心嚢液が大量にみられた。2症例では、ごく軽度かつ多焦点性の大網脂肪壊死がみられた。組織学的分析により、すべての症例における潰瘍形成が、炎症をほとんど伴わない、顕微鏡下の広範囲にわたる上皮壊死および潰瘍形成の領域に対応することが明らかになった。この領域の基部をなす表在性真皮はしばしば破壊され、浮腫および壊死細胞片のために膨張していた。真皮の残りの部分は、壊死が毛包上皮に時折波及していることを除き、ほとんど影響を受けていなかった。3匹のネコには、広範性または小葉中心性の超急性肝壊死が存在した。

【0063】

実施例4：血清学的検査

FCV-Kaos感染後に生き延びた19匹のネコ、および間接的に曝露された可能性はあるが感染していないと推定される2匹の子ネコ（臨床徴候が存在せず、ウイルス培養結果が陰性であることに基づく）から血清を採取した。血清試料は感染または曝露が推定される時期から1～6週後に採取した。血清の4倍系列希釈物を一定量のウイルスと反応させることにより、ウイルス中和力価を判定した。用いた血清の希釈度は、1：4、1：16、1：64、1：256、1：1024、1：4096および1：16,384であった。力価測定のためにはCrandellネコ腎細胞（CrFK）を96ウェルプレートにて用いた。

【0064】

罹患個体血清50μlを、96ウェル培養プレート内で組織培養液により4倍系列で希釈した（1：4～1：16,384、前記）。続いて、約1000TCID₅₀（1000組織培養感染量）のFCVを含む組織培養液50μlを各ウェルに添加し、37℃で1～2時間インキュベートした。続いて各ウェルの血清/ウイルス混合物を、1～2日を経てちょうど集密化したばかりのCrFK細胞を含む培養プレートの対応するウェルに添加した。各血清を3種類のウイルス分離株：FCV-F9（ワクチン株）、FCV-KaosおよびFCV-case53（症例53からの無関係な野外分離株）に対

して検査した。プレートを24時間インキュベートし、典型的なFCV CPE（細胞変性作用）の存在に関して倒立顕微鏡下で観察した。検出可能なCPEを含む最終ウェルをエンドポイントとして読み取った。1：16またはそれを上回る希釈度でのCPEを陽性の結果とみなした。

【0065】

血清学的検査の結果を以下の表1に示している。FCV-Kaos感染症と確定されたネコ、またはFCV-Kaos陽性ネコと同じケージで飼育されたネコのすべてが、FCV-Kaosに対して血清陽性であった。症例53と同じケージで飼育されたすべてのネコがFCV-53に対して血清陽性であり、症例53との既知の接触歴がない第6群の2匹のネコについても同様であった。第2群のネコは症例53およびFCV-Kaosのいずれに対しても直接的には曝露されていなかった。感染の臨床徴候を全く示さなかったこれらのネコは、FCV感染症に関する培養結果が陰性であり、両方のウイルス株に対して血清陰性であった。FCV-F9とFCV-KaosまたはFCV-53のいずれかとの間の交差反応の所見は認められなかった（ウイルス中和抗体レベルが1：4未満）。

【0066】

【表1】

症例番号	群 ¹	ワクチン 接種状況	重症度	FCV 株に対する抗体価			分離された FCV 株
				FCV- case53 ²	ワクチン (FCV-F9)	FCV-Kaos	
53	1	あり	3	1:16	1:16	1:16	FCV-case53, FCV-Kaos ³
41	1	なし	4	1:256	1:16	1:256	FCV-Kaos

10

20

54	1	なし	2	1:256	1:16	1:64	FCV-Jengo ⁴	
52	1	あり	3	1:64	1:64	1:16	なし ⁵	
51	1	あり	2	1:256	1:16	1:64	なし	
40	1	不明	3	1:256	1:16	1:16	なし	
50	1	あり	2	1:1024	1:16	1:64	なし	10
R1 ⁶	2	あり	0	1:4	1:64	<1:4	なし	
R2 ⁶	2	あり	0	<1:4	1:4	<1:4	なし	
32	3	あり	2	<1:4	1:4	1:256	なし	20
33	3	あり	1	1:4	1:4	1:64	FCV-Kaos	
31	4	あり	3	<1:4	1:16	1:64	なし	
35	5	あり	4	<1:4	1:64	1:256	FCV-Kaos	30
36	5	あり	4	1:4	1:16	1:1024	FCV-PM	
34	5	あり	4	<1:4	1:16	1:256	なし	
12	6	あり	4	1:4	1:16	1:64	なし	
18	6	あり	4	1:4	1:4	1:64	FCV-Kaos	
9	6	あり	4	1:4	1:64	1:256	なし	40
10	6	不明	4	1:4	1:4	1:256	FCV-Kaos	
11	6	あり	4	1:16	1:64	1:256	なし	
21	6	不明	4	1:64	1:16	1:256	FCV-Kaos	

1 第1～5群は救援グループからの子ネコであった。各群は別のケージで飼育されたが、いずれもほぼ共通の地域にあり、同じ飼育者によって管理されていた。第6群のネコは診療

- 施設からのものである；これらのネコは別々のケージに隔てられて飼育されていた。
- 2 軽度のURI徴候を有する1匹の救助された子ネコから流行期間中に単離されたカリシウイルスの野外株。
- 3 FCV-case53は症例41との接触前に単離された；FCV-Kaosは症例41との接触後に単離された。
- 4 2匹の救助された子ネコから流行期間中に単離されたカリシウイルスの野外株。どちらのネコも重症肝疾患の徴候を有していた。
- 5 10週にわたる経過観察期間にわたる2～5回の試行でFCVが全く単離されなかった。
- 6 R1およびR2は無症候性である上にカリシウイルス感染に関する培養結果も陽性ではなく、このため症例とはみなさなかった。

10

【0067】

実施例5：組織学的検査

組織試料はすべて10%中性緩衝ホルモル生理食塩水中で固定した。選択した組織をパラフィン中に包埋し、4μm厚の切片にした上で、正に荷電したスライドガラス（Superfrost/plus, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA）上にマウントした。ルーチン的な光学顕微鏡検査のために、組織切片をヘマトキシリンおよびエオジン（HE）で染色した。

【0068】

実施例6：ウイルスの分離、培養およびシーケンシング

77件の培養物を用意した。77件の培養物中19件は1回のサンプリングを行ったネコからのものであり、77件中18件は1～3週間隔で2～5回サンプリングしたネコからのものであった。臨床徴候のピーク時に実施したウイルス分離は、症例の88%（15例/17例）で陽性であった。繰り返しサンプリングしたネコの一部では、間欠的および持続的な放出が観察された。

20

【0069】

カリシウイルスは、ネコ血清、新たに採取した脾臓または肺、EDTAで抗凝固処理した全血、鼻分泌物、または滅菌綿棒試料として採取した上で0.02mg/mlのペニシリンおよびアミカシンを添加した滅菌生食水もしくは滅菌食塩水に移した口咽頭分泌物から単離し、Crandellネコ腎細胞（CrFK）の集密化した単層上で培養した。細胞は、5%CO₂を含む空気中で、Liebovitz L-15培地を2分の1、MEM（Eagle最小必須培地）を2分の1含む増殖培地を用いて37℃で維持した。培地には10%FBS（ウシ胎仔血清）、100UペニシリンG/mlおよび100μgストレプトマイシン/ml培地を含めた。ウイルス感染は、12～52時間での細胞内に特徴的な細胞変性作用（CPE）の存在によって確認した。接種後に、組織培養液をすべての感染細胞から収集し、キット（Qiagen Tissue Kit, Chatsworth, MA）を用いて全RNAを抽出した。逆転写/ネステッド（nested）ポリメラーゼ連鎖反応を、Pedersen, et al, Vet Microbiol 73(4): 281-300 (2000)の記載の通りに行った。培養検査で陽性と思われた分離株はすべてPCR陽性であった。断片をMicrocon-50カラム（Millipore Corp, Bedford, MA）によって精製し、陽性の結果をシーケンシングにより、すなわちシーケンシングサービス（Davis Sequencing, Davis, CA）を用いる自動cDNAシーケンシングによって確かめた。これにより、FCV-Kaosが単離され、cDNAシーケンシングによって確かめられた。事実、すべての陽性結果がcDNAシーケンシングによって確認された。

30

40

【0070】

実施例7：ウイルスの特性決定

症候を有するネコおよび曝露ネコ由来のウイルス分離株のシーケンシングを行い、FCVのいくつかの野外株、ワクチン株（FCV-F9）およびFCV-Ari（Pedersen et al., Vet Microbiol 73: 281-300 (2000)（前記）に記載されたように1998年の北カリフォルニアでの流行時に分離されたVS-FCV株）と比較した。FCV-Kaosのすべての分離株は単一のクレード内にクラスター化し、比較のために用いた他の株とは遺伝学的に異なっていた。FCV-Kaosの分離株は、他の株には認められない3塩基対の欠失を特徴とした。

【0071】

実施例8：感染ネコの統計学的分析

50

データのとりまとめは、Bell Laboratories (以前のAT&T、現在はLucent Technologies) で開発された言語および環境に類似した、統計学的計算およびグラフィックスのための言語および環境である「R」(The R-Development Core Team) にて行った。Rはの異なる遂行形態とみなすことができる。いくつか重要な違いはあるが、Sのために書かれたコードの大半はRでも変更せずに動作する(Richard A. Becker, John M. Chambers and Allan R. Wilks. 「新たなS言語(The New S Language)」, Chapman & Hall, London, 1988)。症例と年齢、ワクチン接種状況および性別との相関についてカイ二乗相関検定により評価した。危険因子に関する単変量評価はオッズ比および信頼区間を算出することによって行った(Rでの関数「odds」)。P<0.05の値を有意とみなした。

【0072】

罹患ネコと12時間以上同時に入院していたか、または罹患ネコと同じ世帯にいたネコの発病率は94%(47例/50例)であった。症例の全体的な致死率は41%(22例/54例)であった。1歳を過ぎたネコでの症例致死率は59%(19例/32例)であり、6カ月齢未満の子ネコでは14%(3例/22例)であった。重症疾患または死亡に関して、成体ネコ(1歳を過ぎている)のオッズ比は子ネコ(6カ月齢未満)よりも有意に高かった(オッズ比9.56、CI=2.82、32.39、p<0.001)。重症疾患および死亡に関して性別は有意な危険因子ではなかった。ネコのうち少数はワクチン接種を受けていないことが判明している；このため、成体ネコではワクチン接種に関連したリスクを評価することができなかった。ワクチン接種状況が判明している子ネコのうち、7例には改良型鼻内生ワクチンが投与され、11例には改良型皮下生ワクチンが投与された。ワクチン接種を受けたこの二群の子ネコの間には疾患の尤度または重症度に関して有意差は認められなかった。

【0073】

実施例9: FCV-Ari

Pedersen et al., Vet Microbiol 73: 281-300 (2000) (前記)に記載されているように、1998年に北カリフォルニアで、出血病様の発熱を伴う、VS-FCVの病毒性の高いワクチン耐性株であるFCV-Ariによるもう1つの流行が報告された。FCV-Ari感染ネコの33~50%が死亡し、この株は伝染性が高く、動物病院および研究施設における衛生学的な措置にもかかわらず汚染された媒介物を介して広がることが判明した。特徴的な臨床徴候には、発熱したネコにおける顔面および肢の浮腫、ならびに一部の症例における先行する徴候をほとんど伴わない突然死が含まれた。1998年の流行の報告以来、出血病様FCVの局地的流行は、Pennsylvania州、Massachusetts州、Tennessee州およびNevada州における少なくとも4つが認められている。

【0074】

実施例10: 疫学的パターン

VS-FCV感染症の臨床例は、急な発現および広がりの特徴とし、謎の多い、漸進的、または急激な転帰を迎える、孤発的な事例であるか、または流行としてのクラスターを形成していた。症例を確定例、疑診例または可能性例として分類した。確定例は、確実な曝露歴のあるネコ(すなわち、罹患がみられた診療施設からのもの、または確定例と接触したものと)と定義され、それからは、同じ流行における既知の症例株と同一のキャプシド超可変領域配列を有するFCV株が回収された。疑診例は、確定例との接触があり、その2週間以内にVS-FCV感染症の臨床徴候を発症したネコ、または確定例との接触があり、その2週間以内に突然死したネコ、または確定例と接触しており、ネコの死亡もしくは臨床的異常の有無にかかわらず、セロコンバージョンに関して血清陽性であるネコと定義した。可能性例は、確定例との接触があり、発熱または上気道感染症(URI)を発症しているが、ウイルス培養および血清学的検査は行われていないネコと定義した。

【0075】

この新たな症候群に関する最初の認識は、北カリフォルニアでの6匹のネコを含む大規模な局地的流行の際に得られ、それらからは常に、FCV-Ariと命名されたFCVのワクチン耐性株が回収された。罹患したのは1つの診療施設で曝露されたネコのみであり、この流行は突然終結した。その後、小規模な流行がPennsylvania州、Massachusetts州、Tennessee

10

20

30

40

50

州およびNevada州で認められている。2002年の夏には、54例の流行がLos Angelesの3つの獣医学診療施設で起こった。この流行の調査は前向き手法で行われ、血清学的、分子的、臨床的および病理学的な情報を包括することにより、この新規病原体の疫学に関して有意な洞察が得られた。VS-FCVはLos Angelesにおける流行時に急速に広がり、罹患ネコと接触した事実上すべてのネコが感染した。最初の4症例はルーチン的な医療を受けるために入院し、発熱および上気道感染症（URI）に加えて、耳介の浮腫および痂皮形成を発症した。この4匹のネコはすべて回復し、その後の追跡は行われなかった。その1週後に、隣接した病院にいたネコが発熱および致死的な心肺停止を伴う超急性VS-FCV感染症を発症した。次の週にかけて、流行は、これらの2つの診療施設における14匹のネコおよび獣医学技師の家にいた2匹のネコへと急速に広がった。8週以内に少なくとも54匹のネコが感染し、以前は完全に健康であった多くの成体ネコを含め、そのうち22匹が死亡した。罹患ネコと12時間以上同時に入院していたか、または罹患ネコと同じ世帯にいたネコの発病率は94%（47例/50例）であった。曝露から最初の臨床徴候までの期間の中央値は4日（範囲は1～12日）であった。家庭内の別の罹患ネコによる二次的な曝露を受けたネコでは潜伏期が比較的長かった。例えば、1匹のネコは最初の曝露から34日後、2回目の曝露から2～15日後に罹病した。入院中に曝露されたネコの場合、曝露と徴候観察時との間に認められた最長の期間は5日であった。臨床徴候のピーク時に実施したウイルス分離は、症例の88%（15例/17例）で陽性であった（FCV培養は、EDTAで抗凝固処理した血液、口咽頭分泌物、または剖検時に採取した脾臓および肺の標本を用いて行った）。標本は、Crandallネコ腎細胞の集密化した単層上で、10%ウシ胎仔血清、100UのペニシリンG/mLおよび100 μg/mLストレプトマイシンを加えたLiebovitz L-15培地およびEagle最小必須培地（1:1）中において、5%CO₂を含む空気中にて37℃で培養した。感染は、12～52時間以内での特徴的な細胞変性作用の存在によって確認した。繰り返しサンプリングしたネコの一部では、間欠的および持続的な放出が観察された。呼吸器FCVの野生株における潜伏期間は1～2日に過ぎず、ウイルス放出は、感染症の臨床徴候の有無にかかわらず、感染後2日～数カ月にわたり、ネコの眼および鼻の分泌物、唾液ならびに糞便からみられた。VS-FCV流行におけるウイルスの波及経路には、ネコからネコへの直接伝播、技師および所有者を介した診療施設間および家庭への媒介物性伝播、ならびに無症候性キャリア入院個体を介した外来受診個体への伝播が含まれた。伝播は、汚染領域を次亜塩素酸ナトリウム溶液で徹底的に消毒した後は減少した。カリシウイルスは乾燥状態にある室温の環境で数週間にわたって持続可能であり、ウサギ出血病（RHDV）を引き起こすカリシウイルスは室温の衣類表面で105日にわたって感染性を保っていた。

【0076】

Los Angelesの流行における全体的な死亡率は40%であったが、6カ月齢を上回るネコでは有意に高い死亡率（59%）が認められ、6カ月齢未満の子ネコにおける死亡率は14%に過ぎなかった（オッズ比9.56、CI = 2.82～32.39、P < 0.001）。罹患ネコの48%は、ネコヘルペスウイルス、FCVおよびネコ汎白血球減少症ウイルスに対するワクチン接種を受けていた（7匹のネコに改良型高抗原量鼻内生ワクチンが投与され、11匹のネコには改良型皮下生ワクチンが投与された）。ワクチン接種が疾患のリスクを高めるか否かにかかわらず、それは防御的ではなかった。性別は重症疾患および死亡に関して有意な危険因子ではなかった。全流行期間は6週間であった。

【0077】

実施例11：病因

VS-FCV感染症は、その臨床的重症度、上皮細胞に対する指向性、多系統攻撃性、全身性血管障害の誘発、ならびに肺、脾臓および肝臓を含む内臓の罹患率の点で特徴的である。2回のVS-FCV流行での7匹のネコを病理学的に極めて詳細に評価した。7匹のネコすべてが皮下浮腫および口腔の潰瘍形成を有し、耳介、肉球、鼻孔および皮膚にさまざまな程度の潰瘍形成を伴っていた。一部の罹患ネコに存在した他の病変には、気管支間質性肺炎ならびに脾臓、肝臓および脾臓の壊死が含まれた。潰瘍の程度および部位には大きな差異があり、最も頻度が高く重度の影響がみられたのは舌背であり、これよりも小規模な潰瘍が硬

口蓋および歯肉にみられた。肢の病変は有毛/無毛接合部での全周性充血から足蹠の腐肉形成までの範囲にわたった。潰瘍は鼻、耳介および有毛皮膚にさまざまな程度で生じていた。すべてのネコが顔面および肢に顕著な皮下浮腫を有していた。組織病理学的には、認められた病変は上皮壊死および潰瘍形成であり、これは基底層、有棘層および有毛皮膚における初期毛包の分節状上皮壊死から、より慢性的な病変での表在層における風船様変性および明瞭な上皮-上皮下辺縁の喪失を伴う全層上皮壊死までを伴う。肉球病変は有毛皮膚と無毛皮膚との境界部で最も重症である。

【0078】

すべてのネコが肺浮腫を有し、4匹のネコは血液を含む胸水を伴い、別の4匹では気管支間質性肺炎がみられた。急性肺病変は、循環白血球増加症、限局性肺胞水腫および肺胞腔における少数の壊死性上皮細胞を呈した。重症病変では、肺胞間質がII型肺胞細胞過形成、肺胞毛細血管における白血球の蓄積および微小血栓によって膨張していた。肺胞には泡沫細胞、壊死細胞片、フィブリンおよび赤血球がさまざまな程度で充満していた。また、多くの罹患ネコは肝臓および膵臓が冒されている徴候も呈し、高ビリルビン血症、低アルブミン血症ならびにASTおよびクレアチンキナーゼの上昇がみられた。3匹のネコでは、膵周囲および大網脂肪壊死の多数の小さな離散状病変がみられた。肝臓が冒されたネコでは、肝細胞のびまん性の個別化から、細胞壊死ないし小葉中心性壊死を伴う肝細胞プレートの広範囲の破壊までに至るものがみられた。炎症は壊死巣に隣接した類洞内好中球の小クラスタに局限されていた。7匹のネコのうち4匹は、隣接した脂肪の鹼化を伴う、多焦点性で超急性の膵臓壊死を有していた。広範囲の脾臓壊死およびリンパ性壊死がそれぞれ1

10

20

【0079】

FCVに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色および透過型電子顕微鏡検査により、罹患した皮膚、鼻粘膜、舌、口腔粘膜、耳介および肉球における内皮細胞および上皮細胞の内部にウイルス抗原が認められた(ホルマリン固定してパラフィン包埋したすべての組織を、Custom Monoclonals Inc., Sacramento, Californiaから提供されたモノクローナル抗体、抗ネコカリシウイルスCV8-1A(c)を用いて免疫組織化学的に染色した)。染色強度は疾患の重症度に比例し、その範囲は初期病変での基底層および有棘層から、慢性病変における上皮全層までにわたった。ウイルスは、粘膜下全体にわたる細管内の内皮細胞内、壊死領域に随伴する膵外分泌腺細胞内、肺の肺胞中隔内、および気管支間質性肺炎の慢性病変内での細気管支の裏打ち細胞内に存在していた。電子顕微鏡検査を用いたところ、ウイルスは肉球の上皮細胞内に観察され、上皮核内に成熟ビリオンを伴っていた。

30

【0080】

VS-FCVによって誘発される疾患は、発熱、浮腫、多臓器不全、出血、ショックおよび死亡として発現される可能性がある。高齢ネコおよび/またはワクチン接種ネコにおける重症疾患のリスクが高いことは、ウイルスによって誘発される直接的な細胞障害のほか、免疫によって媒介される成分があることを示唆する。急性病変では炎症細胞は重症度にかかわらず認められなかった。適応免疫応答が、例えば抗体依存的な増強により、疾患の重症度に寄与した可能性がある。疾患の進行は一次適応応答が関与するには急速すぎるが、ワクチン接種を受けたネコは既往性免疫応答を有していた可能性があり、野外株FCVに対する広範囲にわたる曝露を受けたワクチン未接種ネコの多くもそうであったと考えられる。疾患重症度に関するこの加齢性危険因子は、若齢ウサギは限定的な経過をたどる疾患を体験するが高齢の感染ウサギでは死亡率がほぼ100%であるというウサギ出血病(RHD)におけるそれと類似している。

40

【0081】

サイトカインが寄与する役割を解明し、損傷および疾患に関して考えられる細胞性エフェクターを間接的に明らかにするために、VS-FCV感染症を有するネコの皮膚試料におけるサイトカイン(下記)の評価を行った。罹患組織では対照と比較してTNF- α の統計学的に有意な増加がみられた(P=0.05)。罹患組織では平均で3.8のサイトカイン上昇がみられ

50

たが、対照では1.4のみであり (P = 0,041)、IL-10、TNF- およびMIP-1 のアップレギュレーションが特に顕著であった。

【 0 0 8 2 】

MIP-1 は保存されたC-Cファミリーに属するケモカインであり、さまざまな種類の細胞によって分泌される。これは主としてマクロファージおよび単球に対する化学誘引物質であり、発熱物質である上に、IFN- 産生の増強物質でもある。IL-10は $T_H 2$ $CD4^+$ 細胞、 $CD8^+$ 細胞およびマクロファージによって分泌されるが、これはフィードバックしてマクロファージのさらなるサイトカイン遊離を阻害する。皮膚では、IL-10はマスト細胞およびIgA産生性B-細胞を刺激し、MHC-II発現をアップレギュレートする。TNF- はマクロファージ、リンパ球などに由来する $T_H 1$ 型サイトカインであり、血管透過性を高め、肝臓による急性期応答を刺激し、補体活性化、発熱およびショックを誘導する能力によって、VS-FCVの病因に極めて重要である可能性がある。微小血栓、播種性血管内凝固、最終的には死亡を伴うこれらの変化は内皮および上皮へのウイルス侵入によって惹起され、このことは、RMSFなどにおける炎症性血管炎、細菌内毒素およびカリクレイン-キニン系の活性化、ネコ感染性腹膜炎などにおける免疫複合体の沈着に起因する血管炎、またはウサギ出血病 (RHD) などにおけるウイルスの直接的な組織細胞傷害性および単球浸潤との関連性がある、全身性血管障害のいくつかの病因とは対照的である。

【 0 0 8 3 】

IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p40、IL-18、IFN-、IFN-、TNF-、MIP-1 およびRANTESを含むサイトカインに関して、Foley et al. (Foley, J., C. Rand and C. Leutenegger; in press; 「神経性ネコ感染性腹膜炎における炎症およびサイトカインレベル変化 (Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis); Journal of Feline Medicine and Surgery) の記載内容に変更を加えたcDNAのTaqMan PCRによって評価した。光学顕微鏡で検査したVS-FCV病変または非罹患対照の領域に対応するホルマリン固定皮膚組織を無菌的にパラフィンブロックから切り出し、キシレンにより脱パラフィン処理を行った; RNAをキット (Qiagen Tissue Kit, Valencia, CA) を用いて抽出し、ランダムヘキサデオキシリボヌクレオチド (pd(N)6) プライマー (ランダムヘキサマー; Promega, Madison, WI) およびSuperScript II逆転写酵素 (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) を用いて逆転写を行った。PCRはサーモサイクラー/蛍光光度計 (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) を用いて行い、最終的な定量は、内部較正物質 (GAPDH) に対する相対的転写として報告する比較 C_T 法 (Leutenegger et al. (1999) 「ネコサイトカインmRNAの測定のための定量的リアルタイムPCR (Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA); Veterinary Immunology and Immunopathology 71: 291-305) を用いて行った。罹患試料と非罹患対照との間でサイトカインレベルを対標本t検定によって比較し、P を統計学的有意性を立証するためのカットオフ値とした。

【 0 0 8 4 】

実施例12: 遺伝学的検討および分子ウイルス学

新規FCVに伴う臨床的症候群の急な発生により、新たな遺伝学的FCVバリエーションがその原因である可能性が示唆された。カリシウイルスはエンベロープを持たないプラスセンス一本鎖RNAウイルスであり、これにはFCV、ウサギ出血病ウイルス (RHDV) およびブタ口内発疹ウイルスが含まれる。VS-FCV粒子は32~35nmであり、カリシウイルス科に典型的なホタテ貝状の辺縁および表面の刻み目を有し、中央に電子密度の高い直径20nmのコアがあり、その周りの電子密度はより低く、 $T=3$ 正二十面体対称性を有する。カリシウイルス科の他のメンバーと同じように、FCVは突然変異を起こす率が高く、修復能は低い。

【 0 0 8 5 】

VS-FCV株において生じ、それらを他の「野生株」と区別する特有の変異が存在するか否かを明らかにするために、キャプシドの超可変領域内および全ゲノムレベルでの遺伝学的検討を行った。PCRは以前の記載の通りに行い (Pedersen et al. (2000), 「新規かつ病毒性の強いネコカリシウイルス株によって引き起こされたネコにおける出血病様発熱の特

10

20

30

40

50

異なる流行病 (An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus) ; Veterinary Microbiology 73: 281-300)、罹患ネコおよび非罹患ネコのシーケンシングのためのウイルスキャプシド超可変領域内に235ヌクレオチドのアンプリコンを得た。北部および南部カリフォルニアでのVS-FCV流行による分離株を、North CarolinaおよびFloridaからのVS-FCV、F9 (ワクチン株) およびその他の野外株と比較したところ、Los Angelesからの分離株はすべて単一のクレード内にクラスター化し、比較のために用いた他の株とは遺伝学的に異なっていた。異なる地域からのVS-FCV株は全くクラスター化しなかった。FCV-Kaosの分離株 (Los Angeles由来のもの) は、他の株には認められない3塩基対の欠失を特徴としたが、この欠失は他の流行によるVS-FCVには存在しなかった。FCV-KaosおよびFCV-F9の配列間の相同性は73.4%であり、FCV-KaosおよびFCV-Ari (北カリフォルニア由来のもの) の配列間の相同性は76.5%であった。FCV-Ariはワクチン株との類似性が非常に高かった。

【 0 0 8 6 】

FCV-AriおよびFCV-Kaosの全ゲノム配列を決定し、ワクチン株ゲノムを含む、これまでに報告されている他のゲノムと比較した。このレベルでは、FCV-Ariは続いてワクチンとともにクラスター化したが、FCV-Kaosとは明らかに異なり、この2つの間の相同性は80.3%に過ぎなかった。FCVの3つのリーディングフレームに関して予想されるアミノ酸翻訳物を比較した。オープンリーディングフレーム1 (ORF 1) には、3つのVS-FCV特異的变化のみ (すなわち、VS-FCV株間では一致し、報告されているすべての野外株またはワクチン株とは異なる)、すなわち：位置294でのE D、1055でのN Sおよび1314でのT (野外株では種々のアミノ酸) が存在した。キャプシド遺伝子には、398でのE K、430でのV T、438でのT V、448でのA K、452でのD E、581でのR KまたはD、および592でのS Dという7つのVS-FCV特異的アミノ酸残基が存在し、ORF-3には一致した変化は存在しなかった。キャプシドにおける7つの変化はすべて、398~592という概ね同じ領域内に存在した。興味深いことに、キャプシドにはタンパク質構造の違いがあり、野外株と比較してVS-FCVには1つ余分にグリコシル化部位があることが予測された。

【 0 0 8 7 】

カリシウイルスは、RNAと宿主細胞との付着に働く特有の単一構造のキャプシドタンパク質を有する。このウイルスは多数のアーチ状キャプソメアを有し、そのそれぞれはキャプシドタンパク質の二量体である。変異したキャプシドタンパク質構造の結果として、新規受容体またはその他の宿主-ウイルス相互作用、特に上皮細胞または内皮細胞のターゲティング、およびワクチン耐性の誘導が生じる可能性がある。皮膚の動脈内循環および特有の局所免疫細胞集団 (特に、TNF- α を分泌する樹状細胞) は、VS-FCV-宿主相互作用のさらなる評価のためのもう1つの標的であると考えられる。

【 0 0 8 8 】

本発明の範囲および精神を逸脱することのない、本発明のさまざまな変更物および変形物が、当業者には明らかであろう。本発明を具体的な好ましい態様とともに説明してきたが、請求される本発明はこのような具体的な態様に必要以上に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際には、当業者には明らかな、本発明を実施するために記載した形態のさまざまな変更物が、特許請求の範囲に含まれるものとする。

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

PCT/US2004/007677

Applicant's or agent's file reference 23070-1318P	International application No. PCT/US04/07677
---	---

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>6</u> , line <u>2</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution ATCC American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-209 United States of America	
Date of deposit February 5, 2004	Accession Number PTA-5798
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

10

20

30

40

For receiving Office use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: 17 MAY 2004
Authorized officer H. HERNANDEZ

PCT/US2004/007677

Applicant's or agent's file reference 23070-1318P	International application No. PCT/US04/07677
--	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>9</u> , line <u>30</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution ATCC American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
Date of deposit February 5, 2004	Accession Number PTA-5797
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

10

20

30

40

For receiving Office use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: 17 MAY 2004
Authorized officer <i>H. HERNANDEZ</i>

PCT/US2004/007677

Applicant's or agent's file reference 23070-1318P	International application No. PCT/US04/07677
---	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>31</u> , line <u>16</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution ATCC American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
Date of deposit February 5, 2004	Accession Number PTA-5798
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

10

20

30

40

For receiving Office use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: 17 MAY 2004
Authorized officer <i>H. HERNANDEZ</i>

PCT/US2004/007677

Applicant's file reference 23070-1318P	International application No. PCT/US04/07677
---	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>31</u> , line <u>18</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution ATCC American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
Date of deposit February 5, 2004	Accession Number PTA-5797
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on 17 MAY 2004
Authorized officer H. HERNANDEZ

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

本発明は、好ましい態様を例示するための役割を果たす添付の図面とともに読まれた時に最も良く理解される。しかし、当然のことながら、本発明は図面中に開示された具体的な態様には限定されない。

【図1】キャプシドタンパク質m86379 (SEQ ID NO: 1) ; FCV-Ari (SEQ ID NO: 2) ; FCV-Kaos (SEQ ID NO: 3) ; およびFCV-Bellingham (SEQ ID NO: 4) の最適アラインメントを示している。

【図1 - 1】

```

1
SEQ ID NO: 1 MCSTCANVLK YDWDPHFKL VINPNPFLSV GPCSNPLMCC YPELLPEFGT
SEQ ID NO: 2 MCSTCANVLK YDWDPHFKL TINPNRFLSV GPCDKPLICC YPELLPEFGT
SEQ ID NO: 3 MCSTCANVLK YDWDPLFRL IINPNKFLSV GPCDNPLMCC YPELLPEFGT
SEQ ID NO: 4 MCSTCANVLK YDWDPHFRL VINPNKFLSV GPCDNPLMCC YPELLPEFGT

51
SEQ ID NO: 1 VWDCCDRSPLK IYLESILGDD EWASTFDVAID PVVPPMHKGA AGKIFQPHPG
SEQ ID NO: 2 VWDCCDQSPKQ IYLESILGDD EWASTYDAID PCVPPMHKDE AGKIFQPHPG
SEQ ID NO: 3 VWDCCDQSPKQ IYLESILGDD EWASTYRAID PVVPPMHKDT AGKIFQPHPG
SEQ ID NO: 4 VWDCCDQSPKQ IYLESILGDD EWASTYRAID PCVPPMHKDE AGKIFQPHPG

101
SEQ ID NO: 1 VLMHHLIGKV AAGWDPDLPL IRLEADDGSI TAPEQGTIVG GVIAEPSAQM
SEQ ID NO: 2 VLMHHLINLV AKGWDPDLPL FRLEADDGSI TPEQGTIVG GVIAEPSAQM
SEQ ID NO: 3 VLMHHLIGEV AKANDPNLPL FRLEADDGSI TPEQGTIVG GVIAEPSAQM
SEQ ID NO: 4 VLMHHLIGEV AKANDPNLPL FRLEADDGSI TPEQGTIVG GVIAEPSAQM

151
SEQ ID NO: 1 STAADMATGK SVDSEWEAFF SPHTSVNMST SETQCKILFK QSLGPLLNLY
SEQ ID NO: 2 SAAADMATGK SVDSEWEAFF SPHTSVNMST SETQCKILFK QSLGPLLNLY
SEQ ID NO: 3 STAADMATGK SVDSEWEAFF SPHTSVNMST SETQCKILFK QSLGPLLNLY
SEQ ID NO: 4 SAAADMATGK SVDSEWEAFF SPHTSVNMST SETQCKILFK QSLGPLLNLY

201
SEQ ID NO: 1 LEHLAKLYVA WSGSIEVRFS ISGSGVFGGK LAIVVPPGI DPVQSTSMQ
SEQ ID NO: 2 LSHLAKLYVA WSGSIEVRFS ISGSGVFGGK LAIVVPPGI DPVQSTSMQ
SEQ ID NO: 3 LEHLAKLYVA WSGSIEVRFS ISGSGVFGGK LAIVVPPGI DPVQSTSMQ
SEQ ID NO: 4 LTHLAKLYVA WSGSIEVRFS ISGSGVFGGK LAIVVPPGI EPIQSTSMQ

251
SEQ ID NO: 1 YPHVLFDAKQ VEPVIFCLPD LRSTLYHLMS DDTTSLVIM VYNDLINPYA
SEQ ID NO: 2 YPHVLFDAKQ VEPVIFSPDP LRSTLYHFMG DDTTSLVIM VYNDLINPYA
SEQ ID NO: 3 YPHVLFDAKQ VEPVIFSPDP LRSSLYHLMA DDPPTYLVIM VYNDLINPYA
SEQ ID NO: 4 YPHVLFDAKQ VEPVIFTPDP LRSTLYHLMA DPEPTSLVIM IYNDLINPYA

301
SEQ ID NO: 1 NDANSSGCCIV IVETKPGPDF KPHLLKPPGS MLTHGSPVSD LIPKSSSLMI
SEQ ID NO: 2 NDSNSSGCCIV IVETKPGPDF KPHLLKPPGS MLTHGSPVSD LIPRSSSYWT
SEQ ID NO: 3 NDSNSSGCCIV IVETKPGPDF KPHLLKPPGS MLTHGSPVSD LIPKSSSLMI
SEQ ID NO: 4 NDSNSSGCCIV IVETKPGPDF KPHLLKPPGS MLTHGSPVSD LIPKSSSLMI

```

【図1 - 2】

```

351
SEQ ID NO: 1 GMRVMSDITD FVIRFFVFGA NRHFDENQET AGWSTPRFRP ISVTITEQNG
SEQ ID NO: 2 GMRHWTDTID FVIRFFVFGA NRHFDENQET AGWSSPRFRP ISINISVEKA
SEQ ID NO: 3 GNRHWTDTID FVIRFFVFGA NRHFDENQET AGWSTPRFRP MTINISQKKG
SEQ ID NO: 4 GMRVMSDITD FVIRFFVFGA NRHFDENQET AGWSTPRFRP ITVTISQKKG

401
SEQ ID NO: 1 AKLGIQVATD YIVPGIPDGV PDTTIPGELI PAGDYAIVNG TGNDDITATG
SEQ ID NO: 2 AKLGTQVATD YIVPGIPDGV PDTTIPKELT PAGDYAIVNG SGNDDITKDK
SEQ ID NO: 3 ERLGIGIATD YIVPGIPDGV PDTTIPBELT PAGDYAIVNG T.SDIATKAO
SEQ ID NO: 4 EMLGIGIATD YIVPGIPDGV PDTTIPNKLI PAGDYAIVNG SGNDDITKKE

451
SEQ ID NO: 1 YDTADIIKNN TNFRGMYICG SLQRAWGDKK ISNIAPITTA TLDGDNNNKI
SEQ ID NO: 2 YESADVIKNN TNFRGMYICG SLQRAWGDKK ISNIAPITTG TVK...DNSI
SEQ ID NO: 3 YEAAITITNN TNFRGMYICG SLQRAWGDKK ISNIAPITTG KVEG...NKI
SEQ ID NO: 4 YESAMIISNN TNFRGMYICG SLQRAWGDKK VSNIAPITTA TVK...ENKI

501
SEQ ID NO: 1 NPCKTIDQSK IUVFQDNHVG KKAQTSDDTL ALLGYTGIGE QAIGSDRDRV
SEQ ID NO: 2 IPSNTIDQTK ITVFDIHWG HDQPIISDDTL ALLGYTGIGE BAIGADRDRV
SEQ ID NO: 3 TFSNKIDPTM IAVFQDNHVN LEVQTSDDTL ATLGYTGIGE BAIGADRDRV
SEQ ID NO: 4 IPSNTIDQTK IAVFQDNHVN RDVQTSDDTL ALLGYTGIGE BAIGADRDRV

551
SEQ ID NO: 1 VRISLPLPETG ARGGNHPIFY RNSIKLGYVI RSDIVFNSQI LHTRQSLSLN
SEQ ID NO: 2 VRISVLPETG ARGGNHPIFY RNSIKLGYVI KDIDVFNSQI LHTRQSLSLN
SEQ ID NO: 3 VRISVLPETG ARGGNHPIFY KVKMKLGYVI DGIDVFNSQI LHTRQSLSLN
SEQ ID NO: 4 VRIGVLPETG ARGGNHPIFY RNSIKLGYVI RSDIVFNSQI LHTRQSLSLN

601
SEQ ID NO: 1 HYLLPPDSPA VYRIIDSNBS WFDIGIDSDG FSPVGVSGPG KLEFPLSASY
SEQ ID NO: 2 HYLLSPDSPA VYRIIDSNBS WFDIGIDNDG FSPVGVSGYG NLEFPLTASY
SEQ ID NO: 3 NYLLPPDSPA VYRIIDANGS WFDIGIDSDG FSPVGVSSIG KLEFPLSASY
SEQ ID NO: 4 NYLLSPDSPA VYRIIDSNBS WFSIGSDTDS RIIAVNSTRG KKEFPLRSPC

651
SEQ ID NO: 1 MGIQLAKIRL ASNIRSPMTK L
SEQ ID NO: 2 MGIQLAKIRL ASNIRSGMVK L
SEQ ID NO: 3 MGIQLAKIRL ASNIRSSMTK L
SEQ ID NO: 4 SENQSGKIRS ASFIKTRTK L

```

【配列表】

0004724112000001.app

フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC PTA-5798

- (72)発明者 フォリー ジャネット イー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 デイビス ユニオン ドライブ 1300
- (72)発明者 ハーリー ケイト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 デイビス アデリン プレイス 704
- (72)発明者 ペデルセン ニールス シー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウィンターズ カナル ドライブ 4011
- (72)発明者 ポーランド エイミー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヴァカヴィル バルド イーグル ドライブ 569

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 Vet.Microbiol.,2000,Vol.73,p.281-300

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 1/00-7/08

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)