

ネコカリシウイルスの分子疫学的研究：
カプシド遺伝子塩基配列の系統樹解析
を中心にして

佐藤良治

2003

ネコカリシウイルスの分子疫学的研究：
カプシド遺伝子塩基配列の系統樹解析
を中心にして

佐 藤 良 治

2 0 0 3

目次

1.	緒言.....	1
2.	材料および方法.....	6
2-1	細胞およびウイルス.....	6
2-2	カプシド遺伝子のクローニング.....	7
2-2-1	RNAの抽出.....	7
2-2-2	cDNA.....	7
2-2-3	PCR.....	7
2-2-4	クローニング.....	8
2-2-5	配列の決定.....	8
2-2-6	配列の解析.....	8
2-3	免疫血清.....	9
2-4	理化学的試験.....	9
2-5	中和試験.....	10
2-6	実験感染.....	10
2-7	統計分析法.....	11
3.	成績.....	11
3-1	遺伝子型の検討.....	11
3-1-1	塩基配列の系統樹解析.....	11
3-1-2	アミノ酸の系統樹解析.....	12
3-1-3	アミノ酸の比較.....	13
3-2	疫学的解析.....	13
3-2-1	国別の分布比較.....	13

3-2-2	日本で分離された F C V の地域、県別分布の比較.....	14
3-2-3	年代別による分布.....	14
3-2-4	相同性.....	15
3-2-5	近縁性.....	17
3-2-6	病原性との関連性.....	20
3-2-7	血清学的性状.....	21
3-2-8	抗原性に関連のある E 超可変領域の系統樹解析 と中和抗体の反応性.....	21
3-2-9	E 領域の系統樹解析.....	23
3-3	ワクチンに対する抵抗性の検討.....	24
3-3-1	H10 に対する感染防御.....	24
3-3-2	FCV-S 株に対する感染防御.....	26
4.	考察.....	28
5.	総括および結論.....	37
6.	文献.....	48
7.	謝辞.....	60
8.	英文抄録.....	61
	付表.....	1~16
	付図.....	1~10

1. 緒言

ネコカリシウイルス(FCV)はネコの呼吸器病の原因ウイルスとして Fastier[14]により 1957 年に分離され、我が国を含む世界各国において広く蔓延し、ネコのウイルス感染症として重要である[56]。FCV は小型でエンベロープを持たない 7.69kb のプラス一本鎖 RNA ウイルスであることから[9]、当初ピコルナウイルスと分類されていたが、本ウイルスの粒子の直径が 27~40nm とピコナルウイルスよりやや大きく、表面に 32 個の窪みがみられるという形態学的特徴と 60~70 KDa の単一カプシド蛋白から構成されることが明らかとなり、ピコルナウイルス科と異なることからカリシウイルス科として独立した。そして、最近、猫を宿主とする FCV 以外の動物カリシウイルスとともに遺伝子性状による分類が試みられ[16]、この科は兎出血病ウイルス(*rabbit hemorrhagic disease virus*, *RHDV*)と *European brown hare syndrome virus* からなるラゴウイルス(*Lagovirus*)属、人のカリシウイルスからなる *Norwalk-like viruses* 属、*Sapporo-like viruses* 属からなることが示された。そして、FCV は豚の水疱疹ウイルス(*vesicular exanthema of swine virus*)とともにベジウイルス(*Vesivirus*)属に分類された[18]。本ウイルスの病原

性については呼吸器病[27]の他に、跛行症候群[11、24]慢性胃炎と歯肉炎[29、53]流産[12、57]尿路感染症[32]と関連することが指摘されていた。また最近、高い致死率を持つ兎のカリシウイルス感染症である兎ウイルス性出血病とよく似た症例が報告され注目されていた[43]。この発生は短期間で終息したが、FCV は変異が激しいため、病原性の強いこのような例が再び発生する余地があると示唆されている。このような病原性の違いについては下痢を起こすウイルスが酸抵抗性を示すという指摘はあるが[38]、その他の性状との関連については知られていない。

FCV の血清型はウイルス中和試験によって試みられ、抗原性の相違がみられたが[3]、そのような抗原性の相違は比較的小さく、FCV は血清学的に交差性が強いので一つの血清型の variants とみなされた[2、28、44]。これに対して、人のカリシウイルス[6]および *San Miguel sea lion virus*[51] (SMSV) は明瞭な血清型を有するが、FCV は現在においても特定の血清型が見られない。一方、Kalunda ら(1975)は野外分離株と非常に強い交差性をもつ F9 株を見出し、生ワクチンに利用している[28]。一方、FCV は感染中に猫の体内において抗原性の変化を起こすことが知られている[26]。発症した猫が回復後にワクチ

ン抵抗株を排泄し、キャリアーとなる傾向が見られるため予防上問題視されている[19]。また、最近、わが国の野外分離例の一部において F9 株と抗原性に著しい相違が見られることも報告されている[9、22、30、34]。このように FCV の血清型別ができないため流行株の病原性、地域性、年代、ワクチン抵抗株の出現等に関する疫学的研究を難しくしている。

最近、ウイルスの遺伝子性状が血清学的性状とともにウイルスの分類や疫学に用いられている。FCV の遺伝子の研究はカプシド蛋白の遺伝子について幾つか報告され[5、39、54]、カプシド遺伝子は、A,B,C,D,E,F の6つの領域に分けられた[40、48、50]。FCV、SMSV、、RHDV のカプシド領域の比較により、比較的良く保存された B、D、F 領域と顕著な変異を示す A、C、E 領域に分けられた。このうち FCV の426番目から523番目のアミノ酸配列からなる E 領域は超可変領域と言われ特に変異が激しく[48]、中和抗体と結合する抗原決定基を含むとされている[21、37、41、47、55]。

Seal[49]はこの超可変領域の33アミノ酸配列について系統樹解析を行ない抗原性とE領域との関連を指摘した。その後、FCV 遺伝子の系統樹解析による FCV 感染症の疫学的研究が試みられた。しかし、

血清学的手法[10、35]およびカプシド遺伝子の解析による抗原性と病原性[14]との関連性について検討されたが明瞭な結果が得られなかった。このカプシド蛋白はウイルスが外部環境に直接接触れる部分であり環境の変化に対応するために遺伝的变化を起こし易いとされ注目されている。Geissler ら[14](1997)は異なった臨床症状を呈する疾病(慢性胃炎、急性胃炎、急性呼吸器病、跛行)から分離した FCV のカプシド遺伝子の配列を比較したが、病気と遺伝子の関連性を明らかにすることはできなかった。また、モノクローナル抗体、ウサギ免疫血清によっても病原性との関連性を示す生物性状の存在は証明されなかった。Glenn ら[15](1999)も ORF1、2、3 領域の系統樹解析により病原性、地域(geographic clustering)、年代(temporal clustering)等の疫学的な検討を行ったが、明瞭な成績が得られなかった。

FCV 遺伝子の系統樹解析により遺伝子型を明らかにする一連の試みはうまくいかなかったが、Radford ら[46](1997)はワクチン接種猫から分離したウイルスの遺伝子を系統樹解析し、塩基配列の近縁性によりワクチン由来のウイルスが発病に起因している可能性を指摘した。また、Kuretz ら[31](1998)は FCV255 ワクチン株の猫通過ウイ

ルスの抗原性変異を遺伝子解析により明らかにした。このようにワクチンブレイク(vaccine break)をおこすウイルス感染原因の解明[9]や変異ウイルスの検出に関する報告により遺伝子塩基配列の系統樹解析が疫学的研究に有効な手法であることが示されている。

一方、人のカリシウイルスはカプシドおよび RNA ポリメラーゼの遺伝子解析により遺伝子型別が行なわれ[16、17、19、25]、ウサギの RHDV は 3 種類の遺伝子型別が行われている[1、33]。これに対して、上述のように FCV において他のカリシウイルスに見られるような遺伝子型が認められないのは、利用できる配列データに限られているためではないかと指摘された[15]。このような遺伝子型の解析に使用されている日本の分離株はもっぱら F4 のみが使われている[14、15]。そこで、日本で分離した株(日本株)と他の国で分離されたウイルス(外国株)について遺伝子解析を試み、わが国で流行している FCV の分子疫学的研究を行なった。日本株についてカプシド遺伝子(B~F)部分を RT-PCR 法により増幅し、TA クローニングベクターにクローニングして、塩基配列を外国株と比較した。

本研究により、FCV は二つの遺伝子型に分類されることが明らかとなり、日本特有の系統が存在することが示されたので、地域性につ

いて検討すると共に、ワクチン投与猫から分離された 2 株のワクチン抵抗性について検討した。

2. 材料および方法

2-1 細胞およびウイルス

すべての実験においてウイルスの培養にはネコ腎細胞由来の CRFK 細胞を用いた[8]。CRFK 細胞の培養には 5%牛胎児血清を加えたイーグル MEM を用いた。

今回の遺伝子解析に用いた日本で分離した野外分離株を日本株と呼称し、表 1 に示すような由来を持つ 47 株からなり、このうち FCV-B は脳から分離されたが、他のウイルスはネコの口腔・鼻・目のスワップから分離された。reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) および中和試験、免疫血清の作成には標準株として F9(ATCCVR782)、CFI/68(ATCC VR654)、Bolin(ATCC VR649)を用いた。

日本で分離された株 F4 とオーストラリア、アメリカ、カナダ、ドイツ、ニュージーランドの諸外国で報告された株(外国株)の塩基配列は GenBank から得たものを遺伝子解析に使用した(表 1)。

2-2 カプシド遺伝子のクローニング

2-2-1 RNA の抽出

限界希釈法によりクローニングした FCV の培養上清 15ml に 0.4M の濃度に NaCl を加え、8%のポリエチレングリコール 8000 になるように調製し、8000g 10 分間遠心した沈査を TE 緩衝液 150 μ l で溶かした[23、24]。この部分精製したウイルスから ISOGEN(ニッポンジー、東京)により RNA を抽出した[7]。

2-2-2 cDNA

部分精製ウイルスから得られた RNA の cDNA の作成は 0.1mM の oligo(dT)12-18 を加え、逆転写酵素(Gibco BRL、東京)moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV RT)により cDNA の合成を 60°C1 時間の反応で行い、95°C5 分で熱変性し cDNA を調製した [20]。

2-2-3 PCR

作成された cDNA は Seal(1994) の報告に示されたように、CFI/68 株のカプシド遺伝子領域の塩基配列 1087 から 1757 番目(B-F)をコードし E 超可変領域を含む次のようなプライマーを用い PCR により増

幅した。cDNA にセンスプライマー5' -TTCGGCCTTTTGTGTTCC-3' (理科研、名古屋)とアンチセンスプライマー5' -TTGAGAATTGAACACATC-3' のそれぞれを 100 pmol と *Taq* polymerase(タカラ、東京)を 3 単位ずつ加え、94°C30 秒の熱変性後、50°C30 秒間プライマーとアニーリングし、72°C10 分の伸長を行い、この操作を 25 回反復し増幅した。この PCR により主に 671 塩基対からなる DNA を産生した[49]。

2-2-4 クローニング

PCRにより増幅された日本分離株のDNA産物はマニュアルに従いTAクローニングキット(Invitrogen, San Diego, CA, USA)を用いクローニングした(図 1) [36]。2 つの異なるクローンについて配列を決定した。

2-2-5 配列の決定

FCV カプシド遺伝子を含むプラスミドの塩基配列は *Taq* ポリメラーゼと蛍光色素標識 dideoxynucleotides を用いた ABI オートシーケンサー(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)で決定した[45、52]。

2-2-6 配列の解析

系統樹の解析には PCR 産物の両端のプライマー部分を除いた 370

番目から 580 番目の 211 個のアミノ酸をコードする 1105 番目から 1739 番目のヌクレオチド総数 635 の塩基配列を用い検討した。系統樹の作成は近隣結合法(neighbor-joining, NJ)法を用いて行った。信頼度を検定するためブートストラップ値の算出は 1,000 回の繰り返しを行なって求めた。また、Seal[49]により示された抗原性に関連する E 領域 426 番目から 458 番目の 33 アミノ酸残基について系統樹解析を試みた。この系統樹解析は Seal [49]の報告に従って平均距離法 unweighted pair group method using the arithmetic averages (UPGMA) (Seal 1994)で行った。

塩基配列の決定、アミノ酸配列への変換、ホモロジー(相同性)の比較、系統樹解析は GENETYX-MAC Ver.10、および GENETYX -MAC/ATSQ 3 ソフト(ソフトウェア開発(株)、東京)を用いて行った。

2-3 免疫血清

F9 株に対する猫のポリクローナル抗体は 10^6 TCID₅₀/ml の F9 培養ウイルス液 20ml を約 3 ヶ月齢の SPF 猫に注射器で経口投与し、感染投与後 5 週目に採血して血清を作成した。

2-4 理化学的試験

熱抵抗性試験: ウイルス液を 50°C50 分間加熱した後、感染価

(TCID₅₀)を測定した。

酸抵抗性試験:ウイルス液をpH.3.0とpH.7.0に調節したMcIlrairie緩衝液により1:10に希釈し3時間室温で反応させた後、感染価を測定した。

胆汁酸塩感受性試験:ウイルス液に等容量の0.2%デオキシコール酸ナトリウム(Nacalai tesque Inc., Kyoto)添加維持培地を加え、37°C1時間反応させた後、感染価を測定した。

トリプシン感受性試験:ウイルス液に等容量の1%トリプシン(1:250, Nacalai tesque Inc., Kyoto)添加維持培地を加え37°C1時間反応させた後、感染価を測定した。

2-5 中和試験

すべて96穴のCRFK細胞を培養したマイクロプレートを用い、200TCID₅₀/mlのウイルス液を用いた。ウイルス液と血清は1時間室温で反応させ、培地を加える前に1時間吸着させ、CPEが完全に確認される72時間後に判定した。

2-6 実験感染

H10株については、F9に対する抗原性が低かったため、約3ヶ月齢のSPF猫を一ヶ月毎に3回市販F9生ワクチンを皮下に投与し、

FCV-S 株においては約 10 倍低かったので、1 回のワクチン投与を行なって攻撃した。攻撃はワクチン投与後、約 2 ヶ月後にそれぞれのウイルスを 50ml 経口投与した。臨床観察および中和抗体価を測定した。また、FCV-S は投与後 3 週間目に同様の方法でウイルスを再投与した。

2-7 統計分析方法

中和抗体価の幾何平均値を比較するためにスチューデントの t 検定を、地域性、年代を比較するために χ^2 独立性検定を実施した。なお、 $P>0.05$ については有意差なしと判定した。

3. 成績

3-1 遺伝子型の検討

3-1-1 塩基配列の系統樹解析

FCV から RNA を抽出し、RT-PCR を行い増幅したカプシド蛋白質コード領域を含む 671 塩基対長の DNA 断片を TA クローニングベクターに挿入して得たクローンについて塩基配列を決定した(図 2)。F4 株を含む日本株 47 株と外国株 30 株の合計 77 株の塩基配列について NJ 法により系統樹を作成したところ図 4 に示すように明瞭な 2 遺伝子群(genogroup)に分かれ、77 株のうち 53 株(69%)が遺伝子群 I に、

24株(31%)が遺伝子群 II に属していた。これらのブートストラップ値は 96.5%を呈し、明らかに両群は高い確率で遺伝子型に分けられた。遺伝子群 I はさらに多くの分枝からなるクラスター(C1-7)を形成した。これらのブートストラップ値は低いことから同じ遺伝子群 I に属していた。遺伝子群 II はさらに 99.7%のブートストラップ値を呈して 2 亜群(subgenogroups)(IIa、IIb)を形成した。遺伝子亜群 IIa には 13 株(17%)、IIb 遺伝子亜群には 11 株(14%)が含まれていた。

3-1-2 アミノ酸の系統樹解析

塩基配列をアミノ酸に変換して系統樹の作成を行ったところ、図 5 に示すように塩基配列と同じメンバーからなる 2 遺伝子群 (IA、IIA) に大別された。塩基配列の解析では 96.5%の高いブートストラップ値が認められたが、アミノ酸の場合には 90.5%とやや低い値をとっていた。また、遺伝子群 II は塩基配列において IIa、IIb の 2 遺伝子亜群が明瞭に形成されたが、アミノ酸では 53.6%と低いブートストラップ値を呈することからこれらは遺伝子群とみなされず同じ群として示された。このように塩基配列の解析による方がアミノ酸より高いブートストラップ値を呈することから FCV の遺伝子型別を行うには塩基配列を用いた方が良いことが明らかとなった。

3-1-3 アミノ酸の比較

アミノ酸の系統樹解析により塩基配列と同じように遺伝子群 I、II に大別されたので、両群を分けるアミノ酸の相違について比較検討した。図 3 に示すように遺伝子群 I と遺伝子群 II に相違するアミノ酸配列が見られる。F 領域の 539 番目のアミノ酸はアラニンまたはプロリンがバリンまたはヘニールアラニン、557 番目のグリシンがセリンと、2 箇所のアミノ酸残基が I と II の遺伝子群で異なっていた。

2. 疫学的解析

3-2-1 国別の分布比較

系統樹解析により FCV は 2 系統の遺伝子群に型別されたので、各群に属する FCV を国別にして表 2 に示した。遺伝子群 I についてはドイツ 4 株、イギリス 5 株、カナダ 5 株、アメリカ 9 株、ニュージーランド 1 株を含むオーストラリア 6 株がすべて遺伝子群 I に分布しており、遺伝子群 II にはこれらの外国で分離された FCV は含まれなかった。日本株のうち 23/47(49%)が遺伝子群 I に属し、遺伝子群 II は 24/47(51%)の日本株のみからなっていた。この 2 遺伝子群の間には日本で分離された FCV と他の国の FCV の分布において明らかに差が見られた($P < 0.01$)。

3-2-2 日本で分離された FCV の 地域・県別分布の比較

遺伝子群 I、II に属する日本株について、九州、近畿、関東の各地域別分布状況を表 3 に示した。これによると、九州、近畿、関東で分離された FCV は遺伝子群 I に 64%、58%、33%とそれぞれ分布し、遺伝子群 II には関東では 67%に分布し九州での 36%より多いが、近畿と九州間には顕著な差は見られなかった。

同様に各都道府県において分離された株について、遺伝子群 I、IIa、IIb の各遺伝子亜群の分布状況を表 4 にまとめた。福岡および熊本で分離された 11 株の中で遺伝子亜群 IIb に含まれる株は見られなかった。また、奈良県で分離された 5 株はすべて遺伝子群 I に属していた。大阪および神奈川県で分離された株はそれぞれ 7 株中 5 株(71%)、15 株中 11 株(73%)が遺伝子群 II に属していた。このように県によって分布に相違が見られたが、遺伝子群 I と遺伝子群 II および IIa、b 遺伝子亜群における FCV の県別分布状況に顕著な有意差は見られなかった。

3-2-3 年代別による分布

本研究で用いた外国株の分離された年が日本株に比べると古い傾向が見られたので、日本で分離された株について、遺伝子群 I、II

に含まれる株の年代別分布状況を表 5 にまとめた。1971 年から群 I が見られ年代により多少の分布の違いが見られたが、遺伝子型と年代の相関性は見られなかった。

3-2-4 相同性

日本株 20 株と外国株の塩基配列とアミノ酸配列の相同性を比較し表 6 に示した。遺伝子群 I および遺伝子群 II のそれぞれの間では大体 70%程度の相同性が見られ、塩基配列の最も高い相同性を持つ株は神奈川県で分離された FCV-2 株と FCV-6 株 で 99.8%であった。最も低い相同性を示すものは遺伝子群 I のアメリカの FRI-NCI 株と神奈川の遺伝子群 II の FCV-15 株の 64.4%であった。遺伝子群 II の他の日本株とも同じ程度の低い相同性を呈した。この低い傾向は一部 70%程度の相同性を呈するものもあるが、遺伝子群 I と遺伝子群 II の株一般の間で見られた。ワクチン株 F9 とワクチンを投与した猫から分離した遺伝子群 II の FCV-B 株とは 68.6%と低く、他の遺伝子群 II の株とも FCV-S2 株の 70%以外は 60%程度の相同性を示していた。表には示していないが F9 は同じくワクチンを投与した猫から分離した遺伝子群 I の H10 株とは 73.8%とやや高かった。また、遺伝子群 I の他の日本株とも 70%程度の相同性を示していた。

アミノ酸に変換した遺伝子群 I あるは遺伝子群 II のそれぞれの間では大体 80%程度の相同性が見られており、塩基配列より高くなった。最も低い相同性を示す株は日本株の ML2 株と FPL(Bolin) 株の 67.8%で、アメリカの FRI-NC1 株とは 68.7、アメリカの NADC 株、FCV-5 株、KS20 株、ML3 株とは 69.7%~69.8%と低い相同性を示した。最も高い株は FCV-2 株と FCV-6 株の 100%であった。ML5 株と ML6 株、FCV-15 株と FCV-170 株がそれぞれ 99.5%であった。日本株と外国株との間では 90%以上の相同性を示すものは見られなかった。F9 株と日本株の相同性は遺伝子群 I の ML4 株が 81.8%と最も高く、ML7 株とは 80.4%で、S21 株とは 79.9%であった。上述の H10 株とは 82.2%とやや高い値を示した。遺伝子群 II の FCV-B 株とは 73.8%で、ML1 株とは 70.6%と最も低かった。不活化ワクチン株 FCV 255 株は F4 株とは 74.3%、FCV-B 株と 75.8%と低いが、遺伝子群 I の ML3 株、S21 株、FCV-43 株、H10 株とは 80%以上を呈するものが見られた。CFI/68 株も F4 株とは 71.0%と低く、ML7 株とは 87.7%とやや高かった。ワクチン株 F9 および FCV 255 株はいずれも遺伝子群 II の日本株とは約 70%と低い相同性を示していた。このような 70%程度の低い傾向は遺伝子群 I と遺伝子群 II の株間でも見られた。

3-2-5 近縁性

分子系統樹は横線で塩基配列の置換頻度を表し、分岐部から各配列間への横線の距離の和が長いほど塩基置換数が多く、その2つのウイルスは遠縁ということになる。また、近縁の配列から順番に遠縁の配列へ並べていくのでお互い近い位置にある配列が近縁で、高い相同性を持っていてもその間に他の配列が介在する場合には必ずしも近縁とはいえない。図4のように遺伝子群Iのウイルスによって形成されるクラスターをC1~C7に分け、それぞれの株の近縁性を検討した。各クラスターにおいて、塩基の相同性が比較的低いにもかかわらず、同じ国あるいは同じ地域・県において分離されたウイルスが近くに位置する傾向が見られた。

C1は日本株4株とアメリカ3株、オーストラリア2株、イギリス1株、ドイツ1株の5カ国からなる。1999年に東京で分離されたH10株は奈良で分離されたML12株と近く、福岡で1994年に分離されたK2株はイギリスのLS012株と近かった。アメリカで1957年に分離されたFPL(Bolin)株および1960年に分離されたFRI-NC1株は異なった年に分離されたが高い相同性(塩基相同性97.2%、アミノ酸相同性98.9%)を持ち、顕著な近縁性を示していた。

C2 は 5 株の日本株とドイツ 1 株からなっていた。C3 はオーストラリア 3 株、カナダ 2 株、アメリカ 1 株と北海道 1 株、九州 2 株が加わっていた。このうち、オーストラリアの V274 株と V276 株は相同性(塩基相同性 98.1%、アミノ酸相同性 99.2%)が高かった。C4 はカナダ 3 株とイギリスの 2 株でクラスターを作った。特に、カナダの 3 株(60%)は 1991 年に分離された 2 株 82857-91 株、89243-91 株と 1987 年に分離された 28043-87 株と分離された年が異なっていたが、非常に高い相同性(塩基相同性 95.7%、96.7%、アミノ酸相同性 98.3%、98.4%)を示しており顕著な近縁性を示していた。C5 はドイツ 2 株 KS40 株と KS8 株(塩基相同性 73.6%、アミノ酸相同性 79.8%)とアメリカ 1 株、日本 2 株からなっていた。C6 はイギリス 2 株、アメリカ 3 株、日本 5 株からなっていた。C7 にはニュージーランド 1 株、ワクチン株の F9 株、4 株の日本株が含まれていた。日本株には 2000 年に奈良で分離された ML14 株が含まれていた。アメリカ、カナダ、オーストラリアで分離された株では相同性が高く近縁とみなされる株が認められたが、遺伝子群 I の日本株には高い相同性を持っている近縁関係を示す株は見られなかった。

これに対し、日本株からなる遺伝子群 II の IIa 遺伝子亜群では神

奈川で分離された FCV-1 株、2 株、6 株、11 株が非常に高い相同性(塩基相同性 99.5%~99.8%、アミノ酸相同性 99.5%~100%)を持ち顕著な近縁を示した。FCV-2 株は 1989 年に分離されたが、これ以外の株は 1990 年に分離された。これらの株に比べ、福岡で分離された 3 株 IJ-F-9 株、K10 株、IJ-F-4 株はやや低い相同性を示しているが、近くに位置していた。IIb においても高い相同性を示す株が見られ、神奈川で分離された FCV-15 株と FCV-170 株(塩基相同性 99.5%、アミノ酸相同性 99.5%)、東京、大阪、神奈川で分離された H1 株、ML2 株、ML6 株、ML5 株(塩基相同性 99.2%、アミノ酸相同性 98.6%~99.1%)、同じく神奈川の S1 株、S 2 株、茨城の ND35 株(塩基相同性 99.4%、アミノ酸相同性 98.6%~99.1%)、東京の TOKYO1 の株がそれぞれ非常に高い相同性を持って近縁関係にあった。また、FCV-B 株はこれらの株とやや遠くに存在していた。

アミノ酸に変換して作成した系統樹による近縁関係は図 5 に示すように塩基配列の場合と若干異なっていた。CA1 のワクチン株 F9 は塩基配列の場合と同様に KCD 株と近く、同じクラスターを形成していた日本の 4 株は CA4 と CA5 の別のクラスターを形成した。CA2 のカナダの 3 株は近縁であり同じくカナダで分離された LLK 株(4/5、80%)

とクラスターを形成した。CA1 と CA2 には日本株が含まれていなかった。CA3 は主に塩基配列の C2 のメンバーからなっていた。CA4 の多くは塩基配列の C1 と C6、C7 からなり、アメリカの 5 株(56%)とイギリスの 3 株(60%)を含んでいた。アメリカの FCV-225 株は福岡で分離された K5 株、IJ-F-3 株と近かった。CA5 は日本株 4 株からなり 3 株は九州で分離された。CA6 は 4 株のオーストラリアの株と 2000 年に奈良で分離された ML19 株の 1 株からなっていた。

3-2-6 病原性との関連性

呼吸器病以外の臨床症状を呈した猫から分離された株について近縁性を表 7 にまとめた。FCV-43 株と FCV-170 株は下痢を起こし、pH3 に抵抗性を示した(表 16)。FCV-43 株は塩基配列の系統樹で示した遺伝子群 I の C2 に FCV-170 株は IIb 遺伝子亜群に属し明らかに異なる遺伝子群に所属していた。慢性胃炎を起こした 3 株はそれぞれ C1 と C4 の異なったクラスターを形成した。急性胃炎の 2 株、健康な個体に由来する 2 株もそれぞれ異なったクラスターを形成した。跛行を呈する猫からの 3 株は LLK 株と 2280 株の 2 株が I-C3 に属するがやや隔れた位置にあった。

また、図 6 に兎出血病ウイルスと似た病原性を有する FCV-Ari 株

の E 領域の塩基配列とワクチン投与済みの突然死した猫から分離した FCV-B(S)株およびワクチン投与済みの呼吸器病を呈した猫から分離した H10 株と比較したところ、70.4%、74.7%の相同性を示し、また、F9 株とも 74.5%、77.9%の比較的低い相同性を示した(表 8)。

3-2-7 血清学的性状

日本株 21 株の抗 F9 株免疫猫血清(中和抗体価、1 : 89.6)に対する中和抗体価と遺伝子群との相関性について比較検討を行なった。表 9 のように、遺伝子群 I に 7 株、群 II に 14 株がそれぞれ分かれた。遺伝子群 I の幾何平均抗体価は 20.5 ± 5.5 (平均値 \pm SD)、遺伝子群 II の幾何平均抗体価は 11.3 ± 2.6 (平均値 \pm SD)であった。この 2 群間の抗体価には顕著な有意差は見られなかった。

3-2-8 抗原性と関連のある E 超可変領域の系統樹解析と中和抗体の反応性

Seal[49]により報告された E 超可変領域の系統樹と中和抗体の反応性との関連を検討するため、抗原性と関連のある超可変領域の E 領域(426~458)の 33 個のアミノ酸配列について、UPGMA 法によって系統樹を作成して、日本株 21 株の抗 F9 株免疫猫血清(1 : 89.6)に対する中和抗体の反応性と比較検討した。中和抗体に対する反応性は

Seal が示したように低($\leq 1:1.4$ 以上)、中($1:1.8$ 以上)、高($1:32$ 以上)反応性とした。

図7の系統樹に示すようにFCVはEI-VIIIの群に分かれた。遺伝子群EIにはワクチン株のF9株が含まれ1998年に分離された日本株のS21株と近く、S21株は $1:89.6$ の抗体価を有しF9株と同じ高い中和抗体価を示していた。また、ドイツで分離されたKS109株と近かった。遺伝子群EIIには低い反応性を呈するH10株($\leq 1:1.4$)、FCV-43株($1:5.6$)と中程度のML4株($1:16$)が含まれていた。これらはドイツで分離されたKS8株と遺伝子群を作っていた。遺伝子群EIIIに属する高反応のFCV-5株($1:179.2$)は中程度の反応を呈するFPL-NCI株と異なった群を形成した。遺伝子群EIVには中反応のML3株と高反応のML7株が、カナダで分離された3株、アメリカで分離されたNADC株、ワクチン株のFCV-255株と遺伝子群を形成した。遺伝子群EVのFCV-2株、6株、11株は同じアミノ酸配列を持ち $1:32-89.6$ とほぼ同じ抗体価を示し、カナダで分離された低反応性のLLK株と同じ遺伝子群を形成した。遺伝子群EVIはFCV-B株を含む12株からなり低反応3株、中反応8株(高反応は1株)からなっていた。FCV-15株(神奈川、1990)とFCV-170株(神奈川、1996)の2株はアミノ酸配列が一致し、

H1 株(東京、1998)、ML2 株(大阪、1997)、ML5 株(神奈川、1997)、ML6 株(大阪、1997)の 4 株のアミノ酸配列が一致しこのうち、大阪 2 株 (ML2,ML6)、東京 1 株(H1)、神奈川 1 株(ML5)とそれぞれ異なった地域で検出され、これらの抗体価は似ていた。しかし、この群には唯一抗体価 1 : 32 を有する CFI/68 株の高反応性を呈する外国株が含まれていた。F4 は低反応性の FPL(Bolin)株、FRI-NCI 株と近く遺伝子群 EVIIIを形成した。

S21 株と F9 株は高い反応性を持つがアミノ酸の比較では 7 個の相違が見られた。CFI/68 株のアミノ酸と 11 株の日本株と比較すると一部同じ配列が見られ、CFI/68 株と近い S1 株は 7 ヶ所の違いが見られた。CFI/68 株の 427 番目のグリシンがグルタミン酸に 432 番目のバリンがアラニンに、440 番目のグリシンがグルタミンに、また 446 番目のトレオニン、448 番目のトレオニン、450 番目のアラニン、452 番目のグルタミンがそれぞれアスパラギン、セリン、ロイシン、アラニンに変換していた。やや離れた FCV-15 株とは 13/33(39 %)の相違があった。

3-2-9 E 領域の系統樹解析

これらのアミノ酸配列について NJ 法により系統樹を作成したとこ

る(図 8)、UPGMA 法によって作成されたクラスターとほぼ同じメンバーからなるクラスターを形成したが、これらのクラスターのブートストラップ値は低い値を示し明瞭な遺伝子群を形成しなかった。

3-3 ワクチンに対する抵抗性の検討

ワクチン投与済みの個体から分離された H10 株と FCV-S 株の 2 株は図 4 に示されるように H10 株が遺伝子群 I に、FCV-S 株が遺伝子群 II とそれぞれ別の遺伝子型に属していたことから 1 系統のウイルスであることが判った。そこで、これらの異なる株について市販生ワクチン(F9 株)を投与した猫に対して攻撃しワクチン抵抗性について検討した。

3-3-1 H10 株に対する感染防御

H10 株は、軽度の鼻炎を呈していた個体から分離した(表 10)。本ウイルスは系統樹解析により広く各国で流行している遺伝子群 I に属していたが、表 9 に示すように同じ遺伝子群 I に属するワクチン株 F9 株免疫猫血清(1:89.6)に対して H10 株は $<1:1.4$ と約 64 倍以上の低い値を示したので、市販ワクチンを 3 回投与した 4 頭(No.1~4)とワクチン未接種猫 3 頭(No.5、6、7)に経鼻・経口投与を行い、臨床症状と中和抗体の産生について検討した。

抗体応答について 表 11 に示すように、ワクチン株 F9 を投与した 4 頭の猫は F9 に対して No.1(1:64)、No.2(1:256)、No.3(1:256)、No.4(1 : 8,192)の中和抗体価を有した H10 株による攻撃後、1:64 の抗体を持つ No.1 の F9 株に対する中和抗体は 1 : 358 まで緩やかに上昇し、H10 株(1 : <2)に対して 2 週間後 1 : 45 になりプラトーに達した。1 : 256 の抗体を持つ No.2 は F9 株に対して 1 : 358 まで上昇し、H10 株に対して No.1 とほぼ同様に 2 週間後に 1:128 になりその後低下した。No.3(1:256)は F9 株に対してはほとんど抗体の上昇はなく、H10 株に対して 1 : 45 の抗体価を持っており、1 週後に 1 : 358 まで上昇しプラトーに達した。No.4(1:8,192)は F9 株に対して高い抗体を保有し、H10 株による攻撃後、抗体の上昇は見られなかった。H10 株に対しては 1 : 90 の抗体価を持ち、攻撃後 1 : 256 までゆるやかに上昇した。ワクチン未接種の猫 1 頭は抗体の上昇する 1 週間以内に死亡したので抗体の上昇は確認されなかった。他の 2 頭はどちらの株に対しても感染 3 週間後に 1 : 8,192 以上の上昇を示した。

臨床所見について ワクチン未接種猫の 3 頭は H10 株の攻撃により、No.5 は顕著な 40.8°C の高熱を伴って死亡、No.6、7 の 2 頭は早期に下痢をし、8 日~14 日後に呼吸器症状を呈した(表 12)。ワクチ

ン投与例では一過性に 39.3°Cから 39.8°Cの発熱を呈した。F9 株および H10 株に対して抗体価の低かった猫 No.1 と 2 の白血球が攻撃後 1 日目に増加する傾向が見られ、また、ウイルスの排泄も 13 日と長期に及んだ。しかし、4 頭ともワクチン未接種の個体に比べ呼吸器症状、および死亡例は見られなかった。この成績から F9 ワクチン投与により抗体価の低い個体は長期のウイルス排泄、発熱、白血球増加を伴う感染をするが発症を阻止された。F9 株および H10 株に対しては抗体の上昇は低い方が顕著であるが、抗体価は抗体の高い個体に比べて低い傾向がある。

3-3-2 FCV-S 株に対する感染防御

本ウイルスは表 13 に示されるように 5 頭中 2 頭が突然死した症例から分離したウイルス(FCV-B 株および FCV-S 株)であり、FCV-S 株はワクチンを投与した猫の脊髄から分離された。この株の理化学的性状の特徴は表 16 に示すように pH3 に抵抗性であることである。この株の中和抗体価は F9 株で免疫した猫血清に比べて約 10 倍低かった(表 14)、1 回のワクチン投与を行なった 4 頭の猫(No.3-6)、ワクチンを投与していない猫 2 頭(No.1,2)に対して攻撃し、ワクチン抵抗性について検討した。

FCV-S 株の抗体応答について 表 15 のように、ワクチンを投与した 4 頭は F9 株に対して 1:80 (No.5)、1:160 (No.3)、1:224 (No.4)、1:640 (No.6) の抗体価をそれぞれ有した。No.3、4、5 は FCV-S 株に対して 1:40 以下の抗体価を持ち、FCV-S 株による攻撃後 F9 株に対して 1:10,240 および FCV-S 株に対して 1:5,120 と顕著な抗体価の上昇を認めた。No.6 は FCV-S 株に対して 1:40 の抗体価を持っていたが、同じ様に 1:7,680 の高い抗体の上昇を認めた。しかし、2 回目の投与に対して 4 頭は顕著な抗体応答を示さなかった。これに対してワクチンの投与されていない猫は 2 回目の投与により 1:20,480 の顕著な二次応答を示した。

臨床所見 図 9、10 に示すように、ワクチン未接種の場合と接種のどちらの個体も同じ様に、体温の上昇、白血球の増加、下痢が見られ、糞便におけるウイルス株の排泄は 6 日目まで認められた。また、対照としてウイルスを含まない培養液のみを投与した 3 頭の猫は下痢を起こさなかった。呼吸器症状は見られなかったが顕著なワクチンによる防御効果は見られなかった。2 度目の投与ではいずれの個体も下痢その他の臨床症状を示さなかった。

4. 考察

FCV の遺伝子型について検討するため、本研究ではドイツ、英国、米国、カナダ、ニュージーランドを含むオーストラリア等の諸外国で分離されたウイルス株に日本で分離した株を加え、RT-PCR によってカプシド領域を増幅し、得られた DNA 断片の塩基配列を元に系統樹を作成して解析を試みた。この結果、FCV は高い確率で 2 群に分けられ、それぞれの群を遺伝子群 I、II とした。本ウイルスは今まで一つの遺伝子型からなると報告され、FCV には異なる遺伝子型は確認されないとされてきたが[14、15、49]、本研究により FCV の遺伝子型が初めて明らかにされた。

この遺伝子群 I と II のアミノ酸配列の比較をしたところ、明らかに I、II 群間に異なるアミノ酸が 2 箇所認められた。これらのアミノ酸は超可変領域の E 領域の外側の F 領域にあった。この違いにより型別をすることができるので、型別のみを行いたい場合には極めて有用と思われる。この点については、今後さらに多くの野外株を比較することにより精度の高いものになると思われる。

各群に分布するウイルスを国別に見ると、外国で分離された株はすべて遺伝子群 I に属し、日本で分離された株のほぼ半数が遺伝子 I

を構成していた。これに対して遺伝子群 II は日本で分離された株のみで構成されていた。本研究に用いた外国株は今までの遺伝子解析において報告された株であり、日本で分離された約半数の株と同じ群を構成することから、この群に属するウイルスは広く世界に分布しているウイルスと考えられる。これとは逆に新たに確認された遺伝子群 II は日本株のみから構成されることから、この系統のウイルスは日本から他国へ出ることなく日本国内に限局して流行していると推察される。FCV 遺伝子の系統樹解析に新たにウイルス株を加えるという点については Glenn ら[15]も指摘しており、彼らは実際に英国で分離された株を加えて系統樹解析を試みたが、遺伝子型の特定には至らなかった。このように FCV に明瞭な遺伝子型が存在し地理的關係がみられるという知見は今までに報告されておらず、まったく新しい知見である。また、日本株として系統樹の解析に用いられていた F4 株は今回の系統樹解析において遺伝子群 I に属することが明らかにされ、従来[14、15]で外国株と区別されなかったことを裏付ける成績であった。

遺伝子型が地理的關係を示すにもかかわらず、日本を含む 6 カ国から由来している遺伝子群 I のウイルスでは同じ系統からなること

が示され、分離された国と関連する遺伝子型を確認することはなかった。この成績から、ウイルスが分離された国は異なっているがウイルスの起源は同じなのではないかと推察される。猫は1700年代に英国からアメリカへ、同じく1800年代に英国からオーストラリアに人とともに移住した歴史的背景を持っている。したがって、遺伝子群 I のウイルスの起源は英国あるいはその近隣諸国の猫が保有していたウイルスに由来し、わが国にも同じ起源に由来するウイルスが猫の移動に伴って諸外国から渡来して来たのではないかという可能性を示唆している。一方、遺伝子群 II の日本のみで流行しているウイルス株はさらに2種類の遺伝子亜群に細分化される。この2系統の起源については今後、我が国のウイルスだけではなく、韓国、中国等のアジア近隣諸国との関係について検討する必要がある。

日本国内で流行している遺伝子群 I、II、および遺伝子亜群 IIa、IIb に属しているウイルス株の九州、関西、関東の地域や県別の分布状況に顕著な有意差が見られなかった。このような分布状況から外国から渡来した猫、在来の猫の国内における移動が特定の地域に限局することなく、比較的広範囲に行なわれたのではないかと推察される。

遺伝子型分離と年代の関連性について、今回用いた外国株の年代がやや古い傾向が見られたので、日本株のみを用いて検討したところ年代との関連は認められなかった。この知見は従来の報告と同様であるが、今回の調査は約 10 年に渡る短い期間であり、今後の輸入猫の増加や在来猫の衰退による影響を受けウイルスの分布に違いが見られるようになるかもしれない。

遺伝子群 I、II の日本株 20 株と外国株の相同性を比較すると、塩基配列よりもアミノ酸配列の相同性の方が約 10%程度高かったが、各群内の相同性に比べ両群間では低い傾向が見られ、系統樹解析によって分けられた遺伝子型による相違を裏付けていた。Seal[49] (1994)の報告では C および E 領域の超可変領域の塩基配列の相同性は低いものでは 25%以下、B、D、F 領域は約 70%とされており、今回用いた日本株と外国で分離した株との相同性はほぼこの範囲にあった。今回の成績では示していないが、CFI/68 株の PCR 産物によるサザンハイブリダイゼーションテストでも日本分離株とハイブルダイズする株は見当たらなかったことから、この点についても Seal[49]の成績とよく似ていた。F9 ワクチン接種猫から分離された FCV-B 株、H10 株の相同性はワクチン株 F9 と比べると一致せず、F9

生ワクチンウイルスが原因となるような症例[46]とは異なっていた。また、その他の日本分離株においても F9 株および FCV-255 株ワクチン株と同一のウイルス株は分離されなかった。

遺伝子群 I のアメリカ、オーストラリア、カナダで分離された株の中に塩基配列とアミノ酸配列共に極めて高い相同性を示し、しかも系統樹では隣に位置する非常に近い近縁性を示す株が見られた。また、これらの中には年代を異にして分離されたものがある。この近縁性からある地域で長く流行している株があることを示唆している。このような関係を示すウイルスは遺伝子群 I の日本株においては見られなかった。このような傾向は遺伝子群 I の日本株が広く外国から輸入された猫に由来しているのではないかと思われる。これに対して、遺伝子群 II のウイルスの中には極めて近い近縁性を示す株が見られる。狭い地域内の流行、年代および地域が異なるにもかかわらず近い株の流行が見られる。このような知見から遺伝子群 II のウイルスは国内において極めて類似したウイルスが狭い地域で流行したり、猫の移動とともに広く分布するものがあることを示唆している。

腸炎、慢性、急性胃炎、跛行、健康な猫に由来するウイルスにつ

いて近縁性を検討したところ、従来の報告[15]と同様に塩基配列と十分な関連性は認められなかった。

遺伝子型と血清学的性状の関連性について 20 株を用いて F9 株に対する猫免疫血清を用い中和抗体価を比較したが、顕著な関係がみられなかった。この成績は従来の報告と同様である[14]。

Seal[49]は FCV のカプシド領域の抗原性と関連する E 超可変領域の 426 番目から 458 番目の 33 個のアミノ酸配列の系統樹解析を UPGMA 法により行い、CFI/68 株 に対する中和反応の程度により高、中、低の反応を呈するクラスターに分けられると報告した。この反応に用いられた CFI/68 株ウイルスの抗原性は F9 株と似ていると指摘されているので[5、47]、CFI/68 株の成績とやや異なるのかもしれないが、E 領域の系統樹解析と F9 株に対する反応性について一部のウイルスについて UPGMA 法により検討した。

上述の 377 番目から 576 番目(B~F)のアミノ酸の領域の解析では日本株は F9 株とクラスターを形成しなかったが、この E 領域の解析において、F9 株は日本株の S21 株とクラスターを形成し、F9 株と同程度の中和抗体価を示していた。また、この S21 株は 1998 年に分離されているので、F9 株と抗原性の近い株が流行しているものと考え

られる。生ワクチン F9 株を投与した猫から分離した H10 株は F9 株に対して低い値を示したが、これ以外の分離株では Hohdatsu ら[22] (1999)の報告に見られるような F9 株に対して著しく低い値を示す株は見られなかった。今後、さらに例数を増やしワクチン株との関連について検討する必要がある[46]。また、Radford ら[46] (1997)の示すような F9 株に由来すると見られる配列を持つ株は見られなかった。

日本在来の系統と考えられる 24 株のうち FCV-2、FCV-11、FCV-6 の 3 株は近い配列をしており、それぞれ同じように高い反応性を呈した。しかし、これらの株は低反応性の LLK 株とクラスターを形成することから、同じクラスターを形成してもアミノ酸配列が 11 個から 12 個と大きく異なる場合には抗体に対する反応性が異なるようである。このような傾向は中程度の反応性を呈する日本株の 11 株にも見られ、高反応性を呈する CFI/68 株とクラスターを形成した。このような成績から、抗体に対する反応性は必ずしも Seal[49]の示した成績に一致しないようである。また、この E 超可変領域の形成するクラスターは外国株と日本株が含まれるので地域性とも関連しないようである。ワクチン株の FCV255 株についても Seal[49]の報告では、

CFI/68 株とクラスターを形成し高い中和反応を呈することから両者は似ていることが指摘されている。しかし、今回の成績では FCV255 株と CFI/68 株は別々のクラスターを形成していた。また、CFI/68 株と FCV255 株のアミノ酸の比較により 439 番目から 441 番目のアミノ酸が Asn-Gly-Thr と両者に共通していることからこの配列が抗体の高い反応性と関連しているのではないかと指摘されたが、これらと一緒にクラスターを形成する日本株はこの配列を持っていなかった。このことから、抗体に対する反応性についてはこの配列は関連していないのではと考えられる。

Kreutz ら[31] (1998)の FCV255 株の猫の通過による抗原性の変化の検討では、E 領域の 5 個のアミノ酸の置換により最も大きな変化をした 1 株は親株と別のクラスターを形成するが、抗原性の変化のない株と 2 から 3 個のアミノ酸の置換により抗原性が変化した株は親株と同じクラスターを形成した。このように FCV は猫の通過により抗原性の変化を起こし、同じクラスターに抗体に対する反応性の異なるウイルスを含むようである。

E 領域のアミノ酸の配列について NJ 法により系統樹を作成したところ明瞭な遺伝子型は見られなかった。上述の Kreutz ら[31](1998)

の報告に見られるように抗原性の変化を起こしてもアミノ酸の置換数が少ないと親株と同じクラスターを形成するので、抗原性と関連するこの E 領域は興味のあるところであるが、抗原性と遺伝子型を関連づけることは難しいのではないかと思われる。

生ワクチン F9 株投与猫から分離された 2 株は異なる遺伝子型に属していた。これらのうち H10 株は F9 株と同じように広く世界に分布する遺伝子群 I のウイルスであり、一方 FCV-B 株は日本に分布する特徴を持つ遺伝子群 II のウイルスであった。このようなワクチンブレイクに関連する原因ウイルスは血清学的あるいは遺伝的に検討されている[46]。今回のように明瞭に遺伝子型の異なるウイルスがワクチンブレイクの原因となる報告は初めてである。

H10 株は、ワクチンの投与により F9 株に対する抗体価の高い場合は H10 株に対する抗体価も高くウイルスの排泄が短期で終わり、感染が阻止される。しかし、抗体価が低い場合には抗体価の上昇を認め、感染を受けて鼻口腔内のウイルスの排泄期間が長くなる。ワクチンを投与していない猫は発症したが、ワクチンを投与した猫は発症しなかったことから、H10 株に対する抗体が低くても一過性の発熱、白血球増多が見られるが、発症は阻止されるようである。H10 株は

F9 株と同じ遺伝子群 I に属するウイルスであるが、産生する抗体価が低い場合は十分感染を阻止できない可能性があることから、予防の目的には抗体価を高く上げる必要がある。

FCV-S 株の場合、ワクチン投与例、非投与例のどちらにも下痢を起こすことからワクチンに抵抗性を示すと考えられた。しかし、ウイルスの排泄期間は非投与例と同じ様に短期間で終了した。

現行の主要ワクチンは遺伝子群 I に属するものにより作製されているので、遺伝子群 II 由来のウイルスを用いたワクチンの併用も含めて、今後ワクチンブレイクに関連するウイルス、キャリアーの排泄するワクチン抵抗株の流行状況を遺伝子型と関連づけて検討することにより本疾患の予防およびワクチン開発に役立てることができると思われる。

5. 総括および結論

ネコカリシウイルス(FCV)の分子疫学的研究を行うため、日本株と外国株のカプシド領域(B~F)の塩基配列およびアミノ酸配列(370~580)について系統樹解析による遺伝子型別を行い、分離、年代、地域性、病原性、血清学的検討を行った。また、型別された一部の株

についてワクチンに対する抵抗性を検討した。

1. 遺伝子型の検討

1-1 遺伝子群の解析

FCV は 77 株の系統樹の作成により明瞭な 2 遺伝子群に分かれ、69% が遺伝子群 I に、31%が遺伝子群 II に属し、これらのブートストラップ値は 96.5%と高く、両遺伝子群は高い確率で遺伝子型に分かれることが明らかとなった。

遺伝子群 I は多くの分岐からなるクラスターを形成するが、ブートストラップ値が低いためどれも遺伝子群 I と区別できず、これに対し、遺伝子群 II は 99.7%のブートストラップ値を持って、2 遺伝子亜群(IIa:17%, IIb:14%)を形成した。

1-2 アミノ酸の系統樹解析

塩基配列をアミノ酸に変換して系統樹の作成を行ったところ、塩基配列による場合と同様のメンバーからなる 2 遺伝子群(IA、IIA)に大別され、このブートストラップ値は 90.5%とやや低い値を呈した。IIa、IIb の 2 亜群はブートストラップ値が 53.6%と低い値を呈することから亜群の区別が明瞭でなく、同一の遺伝子群とみなされた。よって、遺伝子型の検討には塩基配列による解析の方が有用で

あることが示された。

1-3 アミノ酸の比較

アミノ酸の多重解析により遺伝子群 I または遺伝子群 II に共通するアミノ酸について比較検討したところ、F 領域の 539 番目のアミノ酸はアラニンまたはプロリンがバリンまたはフェニールアラニン、557 番目のグルタミンがセリンと、2 箇所のアミノ酸残基が I と II の遺伝子群でそれぞれ異なっており、このアミノ酸の違いにより型別を行える可能性が強く示唆された。

2. 疫学的検討

2-1 国別の分布比較

FCV を国別に遺伝子型別したところ、ドイツ、イギリス、カナダ、アメリカ、オーストラリアの外国株と日本株の約半数が遺伝子群 I に属し、遺伝子群 II には外国株は含まれず日本株のみであった。この 2 群の間には明らかな差が見られた ($P < 0.01$)。このことから群 I の FCV は広く世界に、群 II は日本に限局して分布することが明らかとなった。

2-2 日本で分離された FCV の地域・県別分布の比較

I 群に属する日本株は九州、近畿、関東にそれぞれ分布し、地域間

における顕著な差は認められなかった。また、各都道府県における I 群、IIa、IIb の各亜群の分布状況についても顕著な差は認められなかった。

2-3 年代別による分布

日本株について年代別に遺伝子群 I、II の分布を比較したが顕著な差は認められなかった。

2-4 相同性

日本株と外国株の塩基配列は、遺伝子群 I 及び遺伝子群 II の中で、それぞれ約 70%の相同性が見られ、最も高いものは、神奈川で分離された FCV-2 株と FCV-6 株で 99.8%、最も低いものは遺伝子群 I のアメリカ株 FRI-NCI 株と遺伝子群 II の神奈川株 FCV-15 株で 64.4%であった。遺伝子群 I と遺伝子群 II 間の相同性は 60%から 70%程度と低い傾向が見られた。

アミノ酸配列においても同様に遺伝子群 I 及び遺伝子群 II の中でそれぞれ約 80%程度の相同性が見られ、塩基配列よりも高くなった。最も高いものは FCV-2 株と FCV-6 株で 100%、最も低いものは日本株の ML2 株と FPL(Bolin)株で 67.8%を呈した。遺伝子群 I と遺伝子群 II 間の相同性は 70%程度と低く、このような 2 群間における相同性

の低さは遺伝子型の違いを裏付けているものと思われる。また、ワクチン株 F9 および FCV255 株はいずれも遺伝子群 I に属し遺伝子群 II の日本株とは相同性が低く、今回用いた日本株が遺伝的に特異である可能性を示していた。

2-5 近縁性

系統樹により遺伝子群 I に分けられた株を 7 群のクラスター (C1～C7) に分けて近縁性を検討したところ、同国あるいは同地域・県において分離されたウイルスの塩基配列が近くに位置する傾向が見られた。C1 のアメリカで分離された FPL(Bolin)株と FRI-NC1 株は異なった年に分離されたが高い相同性(塩基相同性 97.2%、アミノ酸相同性 98.9%)を示し、この期間に同じ国で流行していたことを示唆している。このような顕著な近縁性を示す例は C3 のオーストラリアの V274 株と V276 株や、C4 のカナダの 3 株にも見られた。これらは、年代を異にして流行していたことを示していたが、遺伝子群 I の日本株には高い相同性を持つ株は見られなかった。しかし、遺伝子群 II のウイルスにおいては、神奈川県で分離された FCV-1 株、2 株、6 株、11 株が互いに非常に高い相同性(塩基相同性 99.5%～99.8%、アミノ酸相同性 99.5%～100%)を示し、同様に遺伝子群 IIb の、神奈川県で分離

された FCV-15 株と FCV-170 株、東京、大阪、神奈川で分離された H1 株、ML2 株、ML6 株、ML5 株、神奈川の S1 株、2 株、茨城の ND35 株、東京の TOKYO1 の株もそれぞれ高い相同性を示した。このように、日本で分離された遺伝子群 II の株についても狭い地域内で流行したり、近縁なウイルスでも異なる地域にまたがって流行していることが明らかとなった。

2-6 病原性との関連性

呼吸器病以外の疾病から分離された株の塩基配列の近縁関係と病原性の相関性について検討した。下痢を起こし pH 3.0 に抵抗性を示した株として FCV-43 株は遺伝子群 I に、FCV-170 株は遺伝子亜群 IIb に属し明らかに遺伝子型が異なっていた。同様に慢性胃炎の 3 株、急性胃炎の 2 株、健康な個体由来のウイルス 2 株はそれぞれ異なったクラスターを形成した。跛行由来の 3 株のうち 2 株は同じクラスターに属していたがやや離れた位置していた。このように塩基配列と病原性は相関しないことが明らかとなった。

兎ウイルス性出血病ウイルスと似た病原性を有する FCV-Ari 株と、突然死した猫から分離した FCV-S 株および実験感染により死亡を認めた H10 株の塩基配列の相同性はそれぞれ 70.4%、74.7%で大きく異

なっていた。

2-7 血清学的性状

日本株 21 株の抗 F9 株免疫猫血清に対する中和抗体価と遺伝子群との関連について検討したところ、遺伝子群 I の平均抗体価は 20.5 ± 5.5 (平均 \pm SD)、遺伝子群 II の平均抗体価は 11.3 ± 2.6 (平均 \pm SD) で、両者に顕著な差は見られず従来の報告と同様、中和抗体と遺伝子型の相関性は見られなかった。

2-8 抗原性と関連のある E 超可変領域の系統解析と中和抗体の反応性

日本株 21 株の抗 F9 株免疫猫血清に対する中和抗体の反応性と、抗原性に関連のある E 超可変領域(アミノ酸配列 426~458)の相関を UPGMA 法で作成した系統樹で検討した。FCV を群 E I - EVIII のクラスターに分け、クラスターの構成メンバーの反応性を比較した。遺伝子群 E I では、F9 株と日本株 S21 株が近く、S21 株は高い中和抗体価 (1:89.6) を示していたが、群によっては異なる反応性を示した。遺伝子群 E II に、低反応性の H10 株、FCV-43 株と、中反応性の ML4 株が群 E III は、高反応性の FCV-5 株が、群 E IV には、高反応性の ML7 株、中反応性の ML3 株が、また群 E V には、同じアミノ酸配列を持ち同程

度の反応性の FCV-2、6、11 株が含まれ、群 EVI は、FCV-B 株を含む日本株 11 株からなり低反応性 3 株、中反応性 8 株であった。FCV-15 株(神奈川、1990)と FCV-170 株(神奈川、1996)はアミノ酸配列が一致し、H1 株(東京、1998)、ML2 株(大阪、1997)、ML5 株(神奈川、1997)、ML6 株(大阪、1997)の 4 株もアミノ酸配列が一致し、これらの抗体価は似ていた。しかし、この群には高反応性の外国株 CFI/68 株が含まれていた。このように抗体に対する反応性とクラスターは必ずしも一致しないことが判明した。また、S21 株と F9 株はアミノ酸の比較では 7 個の相違が見られ、CFI/68 株のアミノ酸と日本株 11 株も一部同じ配列が見られるが、CFI/68 株に近く位置する S1 株とは 7 個、やや離れた FCV-15 株とは 13/33(39%)の相違があり、同じクラスターに属していても高い相同性が見られず、このことは血清学的性状と相関しない理由を裏付けているようである。

2-9 E 領域の系統樹解析

上述のアミノ酸配列について NJ 法により系統樹を作成したところ、これらのクラスターのブートストラップ値は低く同一の群とみなされ、明瞭な遺伝子型に分かれなかった。

3. ワクチンに対する抵抗性の検討

ワクチンが投与された猫から分離された H10 株と FCV-S 株 2 株の遺伝子型を決め、ワクチンに対する抵抗性について検討した。H10 株は遺伝子群 I に、FCV-S 株は遺伝子群 II に属し異なる遺伝子型を示した。この 2 株を用いて市販ワクチン(F9 株)で免疫した SPF 猫に対して攻撃し感染防御能の有無について検討した。

3-1 H10 株に対する感染防御

H10 株は、F9 株免疫猫血清に対して低い抗体価を示したので抗体価を上げるため市販ワクチン(F9 株)を 3 回投与した 4 頭と、ワクチン未接種の SPF 猫 3 頭に経鼻・経口投与を行った。ワクチン未接種猫は H10 株の攻撃によって 1 頭は顕著な高熱を伴って死亡、2 頭は早期に下痢を起こし、8~14 日後に呼吸器症状を呈し回復した。ワクチン接種猫で抗体価の低い猫は H10 株の攻撃に対して抗体の上昇が著しく、抗体価の高い猫は H10 株の攻撃に対して、顕著な抗体の上昇は見られなかったが、抗体価は抗体の高い個体に比べて低い個体の方が低い傾向にある。4 頭共に一過性に発熱したが、呼吸器症状、死亡例はなかった。抗体価の低い猫は、ワクチン未接種猫と同様に白血球数が攻撃後 1 日目に増加する傾向が見られ、ウイルス排泄も 13 日間と長期に及んだ。このことから、ワクチンの投与により抗体価

の低い場合には発症は抑制されたが、感染を阻止できず長期に渡りウイルスを排泄することから、すなわちワクチン抵抗株を産生する可能性が考えられる。

3-2 FCV-S 株に対する感染防御

FCV-S 株はワクチンを投与した猫 5 頭中 2 頭が突然死した症例の脊髄より分離したウイルスで、pH 3.0 に抵抗性を示す。中和抗体価は F9 株免疫猫血清に比べて約 10 倍低かったので、1 回のワクチン投与を行った猫 4 頭とワクチン未接種猫 2 頭に経鼻・経口投与を行った。ワクチン接種猫では抗体価は F9 株に対して 1:80~640 に、FCV-S 株に対して 1:40 以下と低く、FCV-S 株の攻撃後、F9 株及び FCV-S 株に対して顕著な抗体価の上昇を認めた。2 回目の投与に対して 4 頭は顕著な抗体応答を示さなかったが、ワクチン未接種猫は顕著な二次応答を示した。ワクチン接種、未接種どちらの個体も体温の上昇、白血球の増加、下痢が見られ、糞便におけるウイルス排泄は 6 日目まで認められた。また、対照としてウイルスを含まない培養液のみを投与した 3 頭の猫は下痢を起こさなかった。FCV-S 株の攻撃により呼吸器症状は見られないが、下痢を呈するので、本ウイルス株の理化学的性状が pH 3.0 に対して抵抗性を示すことと関連があるようである。

る。また、ワクチンによる明らかな防御効果は見られなかったことから FCV-S 株はワクチン抵抗性を示すものと思われる。しかし、2 度目の投与で、いずれの個体も下痢その他の臨床症状を示さなかったので、適当なワクチンの投与によって予防することが可能ではないかと推測される。今後は群 I のワクチンと群 II の FCV とに由来するワクチンとの併用ができるように、群 II に対するワクチンの開発が我国において非常に重要であると考えられる。

6. 参考文献

1. Arnauld, C., Boilletot, E., Morisse, J.P. and Rasschaert, D. (1998) Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J.Gen.Virol.* 79:11-16.
2. Burki, F., Starustka, B. and Ruttner, O. (1976) Attempts to serologically classify caliciviruses on a national and an international basis. *Infect. Immun.* 14:876-881.
3. Bittle, J.L., York, C.J., Newberne, J.w. and Martin, M. (1960) Serological relationship of new feline cytopathogenic viruses. *Am. J. Vet.Res.* 21:547-550.
4. Carter, M.J., Milton, I.D., Meanzer, J., Bennet, M., Gaskell, R.M. and Turner, P.C. (1992) The nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology* 190:443-448.
5. Carter, M.J., Milton, I.D., Turner, P.C., Meanzer, J., Bennet, M. and Gaskell, R.M. (1992) Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch. Virol.* 122:223-235.

6. Carter, M., J. and Cubitt, W.D. (1995) Norwalk and related viruses. *Curr. Opin. Infec. Dis.* 8:403-409.
7. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
8. Crandell, R.A., Fabricant, C.G. and Nelson-Rees, W.A. (1973) Development and characterization and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In vitro* 9:76-85.
9. Dawson, S., McArdle, F., Bennett, D., Carter, S.D., Bennett, M., Ryvar, R., Gaskell, R.M. (1993) Investigation of vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination. *Vet. Rec.* 132:346-350.
10. Dawson, S., McArdle, F., Bennett, M., Carter, M., Milton, I.P., Turner, P., Meanger, J. and Gaskell, R.M. (1993) Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. *Vet. Rec.* 133:13-17.
11. Dawson, S., Bennet, D., Carter, S.D., Bennett, M., Meanger, J., Turner, P.C., Carter, M.J., Milton, I. and Gaskell, R.M.

- (1994) Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.* 56:133-143.
12. Ellis, T.M.(1981) Jaundice in a siamese cat with in utero feline calicivirus infection. *Aust. Vet. J.* 57:383-385.
 13. Fastier, L.B. (1957) A new feline virus isolated in tissue culture. *Amer J. Vet. Res.* 18:382-389.
 14. Geissler, K., Schneider, K., Platzer, G., Truyen, B., Kaaden, O-R. and Truyen, U. (1997) Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. *Virus. Res.* 48:193-206.
 15. Glenn, M., Radford, A.D., Turner, P.C., Carter, M., Lowery, D., DeSilver, D.A., Meanger, J., Baulch-Brown.C., Bennett, M. and Gaskell, R.M. (1999) Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCVs. *Vet. Microbiol.* 67:175-193.
 16. Green, J., Vinje, J., Lewis, D.C., Galimore, C.I., Koopmanns, M. and Brown, D.W.G. (1997) Genomic diversity among human caliciviruses. In:Chasey D, Gaskell, R M, Clarke

IN, (Eds.), First International Symposium on Caliciviruses, Proceedings of a European Society for Veterinary Virology (ESVV) Symposium, Reading, UK, (1996) ESVV and Central Veterinary Laboratory, pp 37-49.

17. Green, K.Y. (1997) The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. *Arc. Virol.* 13:153-165.
18. Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M., Clark, I., Estes, M., Matson, D., Nakata, S., Neill, J., Studdert, M. and Thiel, H-J. (1999) Taxonomic changes in the Caliciviridae. In: XIth International Congress of Virology. Abstract Book, pp 133
19. Green, S.M., Lambden, P.R., Caul, E.O., Ashley, C.R. and Clarke, I.N. (1995) Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus. Res.* 37:271-283.
20. Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
21. Guiver, M., Littler, E., Caul, E.O. and Fox, A.J. (1992) The

cloning, sequencing and expression of a major antigenic region from the feline calicivirus capsid protein. *J. Gen. Virol.* 73:2429-2433.

22. Hohdatsu, T., Sato, K., Tajima, T. and Koyama, H. (1999) Neutralizing feature of commercially available feline calicivirus (FCV) vaccine immune sera against FCV field isolates. *J. Vet. Med. Sci.* 61:299-301.
23. Jiang, X., Wang, J., Graham, D.Y. and Estes, M.K. (1992) Detection of Norwalk virus in stool using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:2529-2534.
24. Jiang, X. and Estes, M.K. (1995) Detection of human caliciviruses in stools by RT-PCR. In: Beecker, Y., and Darai, G (Eds), *Protocols for diagnosis of human and animal virus diseases*, (Springer-Verlag, Berlin), pp 441-450.
25. Jiang, X., Matson, D.O., Cubitt, W.D. and Estes, M.K. (1996) Genetic and antigenic diversity of human calicivirus (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch. Virol.* 12:251-262.

26. Johnson, R.P.,(1992) Antigenic change in feline calicivirus during persistent infection. *Can. J. Vet. Res.* 56:326-330.
27. Kahn, D.E. and Gillespie, J.H. (1970) Feline viruses X. Characterization of a newly-isolated picornavirus causing interstitial pneumonia and ulcerative stomatitis in the domestic cat. *Cornell Vet.* 60:669-683.
28. Kalunda, M., Lee, K.M., Holmes, D.F. and Gillespie, J.H. (1975) Serological classification of feline caliciviruses by plaque-reduction and immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.* 36:353-356.
29. Knowles, J.O., Gaskell, R.M., Gaskell, C.J., Harvey, C.E. and Lutz, H. (1989) Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. *Vet. Rec.* 124:336-338.
30. Knowles, J.O., Dawson, S., Gaskell, R.M., Gaskell, C.J. and Harvey, C.E. (1990) Neutralisation patterns among recent British and North American feline calicivirus isolates from different clinical origins. *Vet. Rec.* 127:125-127.

31. Kreutz, L.C., Johnson, R.P. and Seal, B.S. (1998) Phenotypic and genotypic variation of feline calicivirus during persistent infection of cats. *Vet. Microbiol.* 59:229-236.
32. Kruger, J.M., Osborne, C.A., Venta, P.J. and Sussman, M.D. (1996) Viral infections of the feline urinary tract. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Prac.* 26:281-296.
33. LeGall, G., Arnauld, C., Boilletot, E., Morisse, J.P. and Rasschaert, D. (1998) Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J. Gen. Virol.* 79:11-16.
34. Lauritzen, A., Jarrett, O. and Sabara, M. (1997) Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. *Vet. Microbiol.* 56:55-63.
35. McArdle, F., Dawson, S., Carter, M.J., Milton, I.D., Turner, P.C., Meanger, J., Bennett, M. and Gaskell, R.M. (1996) Feline calicivirus strain differentiation using monoclonal antibody analysis in an enzyme-linked immuno-flow-assay. *Vet. Microbiol.* 51:197-206.

36. Mead, D.A., Pey, N.K., Herrnstadt, C., Marcil, R.A. and Smith, L.M. (1991) A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechnology* 9:657-662.
37. Milton, I.D., Turner, J., Teelan, A., Gaskell, R., Turner, P.C. and Carter, M.J. (1992) Location of monoclonal antibody binding sites in the capsid protein of feline calicivirus. *J. Gen. Virol.* 73:2435-2439.
38. Mochizuki, M. (1991) Different stabilities to bile among feline calicivirus strains of respiratory and enteric origin. *Vet. Microbiol.* 31:297-302.
39. Neill, J.D., Reardon, I.M. and Heinrikson, R.L. (1991) Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* 65:5440-5447.
40. Neill, J.D. (1992) Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus: identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus sequences. *Virus Res.* 24:211-222.
41. Neill, J.D., Sosnovtsev, S. and Green, K.Y. (1997)

Structure/function studies of the capsid protein of calicivirus: domain swaps between different feline calicivirus strains. In: Chasey D, Gaskell RM, Clarke IN, (Eds.), First International Symposium on Caliciviruses, Proceedings of a European Society for Veterinary Virology (ESVV) Symposium, Reading, UK, (1996) ESVV and Central Veterinary Laboratory, pp. 120-124.

42. Pedersen, N.C., Laliberte, L. and Ekman, S.,(1983) A transient febrile 'limping' syndrome of kittens caused by two different strains of feline calicivirus. *Feline Practice* 13:26-35.

43. Pedersen, N.C., Elliott, N.J., Glasgon, A., Poland, A. and Keel, K. (2000) An isolated epizootic of hemorrhagic like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* 73:281-30.

44. Povey, R.C. (1974) Serological relationships among feline calicivirus. *Infct. Immun.* 10:1307-1314.

45. Prober, J.M., Trainor, G.L., Dan, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zaquorsky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A.

- and Burmeister, K. (1977) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341.
46. Radford, A.D., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Turner, P.C., Glenn, M.A. and Gaskell, R.M. (1997) The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures. *Vaccine* 15:1451-1458.
47. Shin, Y.S., Tohya, Y., Oshikamo, R., Kawaguchi, Y., Tomonaga, K., Miyazawa, T., Kai, C. and Mikami, T. (1993) Antigenic analysis of feline calicivirus capsid precursor protein and its polypeptides produced in a mammalian cDNA expression system. *Virus Res* 30:17-26.
48. Seal, B.S., Ridpath, J.F. and Mengeling, W.L. (1993) Analysis of feline calicivirus capsid protein genes: identification of variable antigenic determinant regions of the protein. *J. Gen. Virol.* 74:2519-2524.
49. Seal, B.S. (1994) Analysis of capsid protein gene variation

- among divergent isolates of feline calicivirus. *Virus Res.* 33:39-53.
50. Seal, B.S. and Neill, J.D. (1995) Capsid protein gene sequence of feline calicivirus isolates 255 and LLK: further evidence for capsid protein configuration among feline caliciviruses. *Virus Genes.* 9:183-187.
51. Smith, A.W., Skilling, D.E. and Latham, A.B. (1981) Isolation and identification of five new serotypes of caliciviruses from marine mammals. *Virus Res.* 42:693-694.
52. Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heines, C., Kent, S.B.H. and Hood, L.E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:673-681.
53. Thompson, R.R., Wilcox, G.E., Clark, W.T. and Jansen, K.L. (1984) Association of calicivirus infection with chronic gingivitis and pharyngitis in cats. *J. Sm. Anim. Pract.* 25:207-210.
54. Tohya, Y., Taniguchi, Y., Takahashi, E., Utagawa, E., Takeda,

N., Miyanuram, K., Yamazaki, S. and Mikami, T. (1991b)
Sequence analysis of the 3'-end of feline calicivirus
genome. *Virology* 183:810-814

55. Tohya, Y., Yokoyama, N., Maeda, K., Kawaguchi, Y. and
Mikami, T.(1997) Mapping of antigenic sites involved in
neutralization on the capsid protein of feline calicivirus. *J. Gen.
Virol.* 78:303-305.

56. Umehashi, M., Imamura, T., Hara, M., Akiyama, S., Kageya
T., Muto, M., Satoh, Y., Tokiyoshi, S. and Suzuki, T. (2000)
The therapy by mouse-cat chimeric antibodies against feline
herpers-1 and feline calicivirus. *J. Vet. Med.* 53:889-894.

57. VanVuuren, M., Geissler, K., Gerber, D., Nothling, J.O.
and Truyen, U.(1999) Characterisation of a potentially
abortigenic strain of feline calicivirus isolated from a
domestic cat. *Vet. Res.* 144:636-638.

7 謝 辞

本研究を終えるにあたり、御助言と御指導を賜った化血研（財団法人化学及血清療法研究所）時吉幸男氏、坂本國昭氏、秋山俊介氏、（株）インターベット 中央研究所 種子野章氏、石川義久氏、Dr.A.Mockett (U.K)、九州大学医学部名誉教授 石井洋一先生に謝意を表します。また、実験の遂行にあたり御指導、御助力をいただきました麻布大学名誉教授 小林貞男先生、福山正文教授、古畑勝則先生に謹んで感謝いたします。また本研究の推進のためご協力を賜った（財）化血研、（株）インターベットに深謝いたします。

さらに、本論文の御校閲を賜った麻布大学名誉教授 田淵清先生ならびに、麻布大学獣医学部 原元宣教授、藤谷英男教授、木内明男教授に謝意を表します。最後に、本研究の遂行に当たり終始実験を補助していただいた遠藤依子氏に深甚なる謝意を表します。

Molecular epidemiological study of feline
calicivirus with emphasis on phylogenetic
analysis of the nucleotide sequence
of the capsid gene

(Summary)

2003

Yoshiharu SATO

Feline calicivirus(FCV) causes an acute, highly contagious disease in cats especially in kitten. That is called the FCV infection characterized by upper respiratory disease, pneumonia, ulcerative stomatitis or gingivitis, and occasionally, enteritis or arthritis. The FCV particle is recognized by nonenveloped icosahedral symmetry with a diameter of 27 to 40 nm. The virion consists of a positive single-strand of nonsegmented RNA with 32 cup-shaped depressions on the capsid. The capsid is composed of a single major polypeptide, and serologically, the FCV is regarded as belonging to one single serotype.

The molecular epidemiological study of FCV was performed and induced a genotypic classification for Japanese and foreign strains by phylogenetic analyses of the nucleotide sequences and amino acid sequence(370~580) of the capsid-coding regions(B through F) with examination of their isolations, ages, locality, pathogenicity and serological properties. These results suggest usefulness of developing a novel vaccines directed against strains for which conventional vaccine has limited effectiveness.

1. Genotyping

1-1 Genotype grouping

The construction of a phylogenetic tree for 77 strains divided FCVs into two distinct groups of genes. Of the 77 strains, 69% and 31% belonged to gene group I and II, respectively. Their bootstrap values were high at 96.5%, showing that both gene

groups were divided into two genotypes with a high probability.

Gene group I formed clusters consisting of many branches, but their low bootstrap values did not allow any of them to be distinguished from gene group I, whereas gene group II indicated a bootstrap value of 99.7% and formed two gene subgroups (IIa 17%, IIb 14%).

1-2 Phylogenetic analysis of amino acid sequences

A phylogenetic tree was constructed by converting nucleotide sequences into amino acid sequences, which were broadly divided into two gene groups (IA, IIA) consisting of similar members as in the phylogenetic tree of nucleotide sequences. Since the IIa and IIb subgroups could not be clearly distinguished because of a low bootstrap value of 53.6%, they were regarded as the same gene group. These results indicate that nucleotide sequence-based analysis is more sensitive in analyzing genotypes.

1-3 Comparison of amino acids

Multivariate analysis of the amino acids common to group I or II showed that gene groups I and II differed in two amino acid residues, that is, the amino acids at position 539 in the F region were alanine or proline in group I and valine or phenylalanine in group II, and those at position 557 were glutamine and serine, respectively.

2. Epidemiological analysis

2-1 Comparison of distribution by country

Genotype classification of FCVs by country of origin showed that the foreign strains (German, English, Canadian, USA and

Australian) and about half of the Japanese strains belonged to gene group I, while gene group II consisted only of Japanese strains without any foreign strains. There was thus a clear difference between the two groups ($p < 0.01$). These results indicate that FCVs of group I are widely distributed throughout the world, while group II FCVs are restricted to Japan.

2-2 Comparison of distribution of Japanese FCV by regions and prefectures of isolation

Japanese strains belonging to group I were distributed in the Kyushu, Kinki and Kanto regions, showing no significant differences among regions. No significant differences were noted in the distribution of group I and subgroups IIa and IIb either.

2-3 Distribution by ages

The distribution of gene groups I and II of Japanese strains did not differ significantly according to ages.

2-4 Homology

The Japanese and foreign strains showed approximately 70% nucleotide sequence homology within each of gene groups I and II. The highest homology of 99.8% was found between the FCV-2 and FCV-6 strains isolated in Kanagawa prefecture, while the lowest homology of 64.4% was observed between the USA strain FRI-NCI and the Kanagawa strain FCV-15. The homology between group I and II tended to be low at 60% to 70%.

Strains within each of gene groups I and II had approximately 80% amino acid sequence homology, higher than nucleotide sequence homology. The FCV-2 and FCV-6 strains

showed the perfect match of 100%, and the Japanese strains ML2 and FPL(Bolin) showed the lowest homology of 67.8%. The homology between gene groups I and II was low at about 70%, in agreement with the difference in genotypes. The vaccine strains F9 and FCV255 belonging to gene group I had low homology with the Japanese strains in gene group II, suggesting that the Japanese strains used in this study are genetically distinct.

2-5 Relationship

The strains classified as gene group I were divided into seven clusters(C1 through C7) to analyze their relationship. The nucleotide sequence of FCVs isolated in the same country, region or prefecture tended to be located close to each other. The FPL(Bolin) and FRI-NCI strains belong to C1 isolated in USA in different years shared a high homology(97.2% nucleotide homology and 98.9% amino acid homology), suggesting that they prevailed in those years in the same country. Such marked relationships were also found in the Australian strains V274 and V276 in C2 and three Canadian strains in C4.

These strains originated from prevalent disease in different years did not show a significantly high homology with the Japanese strains in gene group I. On the other hand, among gene group II viruses, the FCV-1, FCV-2, FCV-6 and FCV-11 strains isolated in Kanagawa showed high homology with one another(99.5% to 99.8% nucleotide homology and 99.5% to 100% amino acid homology). Similarly, among gene subgroup IIb, the FCV-15 and FCV-170 isolated in Kanagawa, the H1, ML2, ML5

and ML6 strains isolated in Tokyo, Osaka and Kanagawa, the S1 and S2 strains in Kanagawa, the ND35 strain in Ibaraki and the TOKYO 1 strain in Tokyo showed high homology with each other. Thus, gene group II strains isolated in Japan also prevail in a limited area, and closely related viruses prevail over different regions.

2-6 Relation to pathogenicity

The relationship was investigated between the nucleotide sequences of strains isolated from cats without any respiratory symptoms and their pathogenicity. Among strains causing diarrhea and showing resistance to pH 3.0, the FCV-43 and FCV-170 strains belonged to gene group I and gene subgroup IIb, respectively, clearly indicating different genotypes. Similarly, three strains causing chronic gastritis, two strains causing acute gastritis, and two strains from healthy individuals formed different clusters. Two of the three strains derived from cats with claudication belonged to the same cluster, but was located a little apart from each other. Thus, it became clear that nucleotide sequences did not correlate with pathogenicity.

The FCV-Ari strain having similar pathogenicity to rabbit hemorrhagies disease virus showed very low nucleotide sequence homology of 70.4% and 74.7%, with the FCV-S strain isolated from a cat dying suddenly and the H10 strain from cats dying of experimental infection, respectively. This is indicating a great genotype difference.

2-7 Serological properties

The relationship between the neutralizing antibody titers of feline anti-F9 serum against 21 Japanese strains and the gene groups was analyzed. The mean antibody titers against gene groups I and II were 20.5 and 11.3, respectively, with no significant intergroup difference. These indicate no association between antibody titer and genotype as shown to date.

2-8 Phylogenetic analysis of antigenicity-related E hyper-variable region and neutralizing antibody reactivity

Using a phylogenetic tree constructed by the UPGMA method, the correlation was investigated between the reactivity of the 21 Japanese strains for the neutralizing antibody in feline anti-F9 serum and the antigenicity-related E hypervariable region (amino acid sequences 426-458). FCVs were divided into clusters EI through EVIII to compare the reactivity of the cluster-composing members. In gene group I, the F9 strain and the Japanese strain S21 were close to each other, and the S21 strain had a high antibody-neutralizing titer (1:89.6), but the reactivity differed according to groups. Gene group II included the low-reactive H10 and FCV-43 strains and moderately reactive ML4 strain; group III, the high-reactive FCV-5 and moderately-reactive FPL-NC1 strain; group IV, the high-reactive ML-7 strain and moderately-reactive ML-3 strain; group V, the FCV-2, FCV-6 and FCV-11 strains with the same amino acid sequence and similar reactivity; and group VI consisted of 11 Japanese strains (three low-reactive strains and eight moderately-reactive strains) including the FCV-B strain. The

FCV-15 strain(Kanagawa, 1990) and the FCV-170 strain (Kanagawa, 1996) had the identical amino acid sequences, and the H1 strain(Tokyo, 1998), the ML2 strain(Osaka, 1997), the ML5 strain(Kanagawa, 1997), and ML6 strain(Osaka,1997) also had the identical amino acid sequence and similar antibody titers. However, this group included the high-reactive foreign CFI/68 strain. Thus, the reactivity to antibody did not agree with clusters. The S21 and F9 strains differed in amino acid sequence at seven positions. The CFI/68 strain had the same amino acid sequence as some of the 11 Japanese strains, but differed in seven amino acids from the S1 strain located close to CFI/68 strain and in 13/33(39%) from the FCV-15 strain located a little apart from the CFI/68 strain. Thus, strains in the same cluster did not show high homology and this supported non-correlation between E hypervariable region amino acid sequences and serological properties.

2-9 Phylogenetic analysis of genetic E hypervariable region

A phylogenetic tree of the above described amino acid sequences was constructed by the NJ method. These clusters were regarded as the same group because of their low bootstrap values, and did not fall into distinct genotypes.

3. Evaluation of resistance to vaccines

The H10 and FCV strains isolated from vaccinated cats were genotyped and evaluated for resistance to vaccines. The H10 strain and FCV-S belonged to gene group I and II, respectively, showing different genotypes. SPF cats immunized with a

commercially available vaccine(F9 strain) were challenged with these two strains, and evaluated for anti-infection ability.

3-1 Protection against H10 infection

Since the F9-immunized cat's sera were detected only a low antibody titer against the H10 strain, four cats were inoculated three times with a commercially available vaccine(F9 strain) to raise antibody titers. These four SPF cats and three unvaccinated SPF cats were administered the H10 strain nasally and orally. Of the unvaccinated cats challenged with the H10 strain, one died with high fever, and two had diarrhea in the early stage, recovering eight to 14 days later with respiratory symptoms.

Vaccinated cats with low antibody titers showed a marked increase in antibody titers on the challenge with the H10 strain. The cats with high antibody titers did not show a marked increase in antibody titers, but tended to have higher antibody titers than the cats that showed low antibody titers. All four cats developed transient fever, but survived without any respiratory symptoms. Similar to the unvaccinated cats, the cats with low antibody titers tended to show an increase in white blood cell count 1 day after the challenge, excreting viruses for as long as 13 days. These results indicate that vaccine administration suppresses the onset in cats with low antibody titers, but can not inhibit the infection, secreting viruses for long periods, and suggest the possibility of producing a vaccine-resistant strain.

3-2. Protection against FCV-S infection

FCV-S was a strain of FCV isolated from the spinal cord of

two cats (of five vaccinated cats) dying suddenly, and showed resistance to pH 3.0. Since the neutralizing antibody titer was about 10 times lower than that in F9-immunized cats, the FCV-S strain was administered nasally and orally to four cats that had been vaccinated once and two unvaccinated cats. The antibody titers were low at 1:80~640 against the F9 strain and 1:40 against the FCV-S strain, and markedly increased against the F9 and FCV-S strains after challenge with the FCV-S strain. The four cats did not show a marked antibody response on the second administration, whereas the unvaccinated cats showed a marked secondary response. Both the vaccinated and unvaccinated cats had an elevated temperature and elevated white blood cells and diarrhea, and excreted viruses for six days. Three control cats that had been administered only culture medium containing no viruses had no diarrhea. Challenge with the FCV-S strain did not produce respiratory symptoms but caused diarrhea. This appears to be related to the fact that this strain has the physicochemical property of being resistant to pH 3.0. Since no protective effect of vaccination was observed, the FCV-S strain seems to have a resistance to the vaccine. However, the second administration did not cause diarrhea or other clinical symptoms, suggesting that the administration of appropriate vaccines prevents infection. It is considered that in the future, it is important to develop vaccines against FCVs in gene group II so that they can be used in combination with vaccines against FCVs in gene group I.

Table 1 Origins of FCV isolates analysed in this study

Isolate	Year	Country	Location	Disease Complex	GenBank
KS20	1994	Germany		Chronic stomatitis	X99447
KS8	1994	Germany		Acute Stomatitis	X99449
KS40	1995	Germany		Acute respiratory disease	X99448
KS109	1995	Germany		Chronic stomatitis	X99446
KCD	1957	New Zealand		Acute respiratory disease	L09719
258cvs484	Unknown	Australia		Unknown	AF038383
V276	Unknown	Australia		Upper respiratory disease and Ocular disease	AF032106
V83	1972	Australia		Pneumonia	AF031876
V77	1979	Australia		Abortion,throat ulcers	AF038126
182cvs5A	1980	Australia		Conjunctivitis, Ocular disease	AF031875
V274	1989	Australia		Upper respiratory disease and Ocular disease	AF031877
LS015	1985-1988	UK**		Chronic stomatitis	AF109464
F65	1990	UK		Imeness and OD	AF109465
A4	1973	UK		URTD	AF109468
JOK63	1985-1988	UK		URTD and OD	AF109466
LS012	1985-1988	UK		Chronic stomatitis	AF109467
FPL(Bolin)	1957	USA*		Panleukopenia	U06652
FS	1958	USA		Stomatitis	U06650
FRI-NCI	1960	USA		Upper respiratory disease, conjunctivitis	U06647
Urbana	1960	USA		Upper respiratory disease and Ocular disease	L40021
F9	1960	USA		Upper respiratory disease and Ocular disease	M86379
CFI/68	1960	USA		Upper respiratory disease, conjunctivitis	U13992
FPL-NCI	1960	USA		Enteritis	U06653
FCV-255	1970	USA		Pneumonia and Ocular disease	U06646
NADC	1986	USA		Healthy	L19718
LLK	1983	Canada		Limping syndrom	U17131
2280	1983	Canada		Limping syndrom	X99445
28043-87	1987	Canada		Unknown	U06645
82857-91	1991	Canada		Unknown	U06648
89243-91	1991	Canada		Unknown	U06651
F4	1971	Japan	Tokyo	Acute respiratory disease	D31836
ND35	Unknown	Japan	Ibaraki	Unknown	AB055445
FCV-1	1996	Japan	Kanagawa	Acute respiratoty disease	this paper
FCV-2	1989	Japan	kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055446
FCV-5	1990	Japan	kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055447
FCV-6	1990	Japan	kanagawa	Healthy	AB055448
FCV-11	1990	Japan	kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055449
FCV-15	1990	Japan	kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055450
FCV-B	1993	Japan	kanagawa	Exiting,death	AB055451
FCV-43	1994	Japan	kanagawa	Upper respiratoty disease and diarrhea	AB055452
FCV-170	1996	Japan	kanagawa	Upper respiratoty disease and diarrhea	AB055453
ML1	1996	Japan	kanagawa	Unknown	AB055454
ML2	1997	Japan	Osaka	Unknown	AB055455
ML3	1997	Japan	Tokyo	Unknown	AB055456
ML4	1997	Japan	Osaka	Unknown	AB055457
ML5	1997	Japan	Kanagawa	Unknown	AB055458
ML6	1997	Japan	Osaka	Unknown	AB055459
ML7	1998	Japan	Hokkaido	Unknown	AB055460
ML12	2000	Japan	Nara	Unknown	this paper
ML13	2000	Japan	Nara	Unknown	this paper
ML14	2000	Japan	Nara	Unknown	this paper
ML19	2000	Japan	Nara	Unknown	this paper
S1	1998	Japan	Kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055461
S2	1998	Japan	Kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055462
S21	1998	Japan	Kanagawa	Acute respiratoty disease	AB055463
Tokyo 1	1998	Japan	Tokyo	Respiratoty disease	this paper
H1	1998	Japan	Tokyo	Acute respiratoty disease	AB055464
H10	1999	Japan	Tokyo	Respiratoty disease	AB058648
H17	1999	Japan	Tokyo	Respiratoty disease	this paper
K1	1994	Japan	Kumamoto	Unknown	AB058649
K2	1994	Japan	Fukuoka	Unknown	AB058650
K3	1994	Japan	Nara	Unknown	AB058651
K4	1994	Japan	Osaka	Unknown	AB058652
K5	1994	Japan	Fukuoka	Unknown	AB058653
K7	1994	Japan	Osaka	Unknown	AB058654
K8	1994	Japan	Osaka	Unknown	AB058655
K9	1994	Japan	Osaka	Unknown	AB058656
K10	1995	Japan	Fukuoka	Unknown	AB058657
K11	1995	Japan	Fukuoka	Unknown	AB058658
K12	1995	Japan	Kumamoto	Unknown	AB058659
IJ-F-3	1998	Japan	Fukuoka	Respiratoty disease	AB058660
IJ-F-4	1998	Japan	Fukuoka	Respiratoty disease	AB058661
IJ-F-5	1998	Japan	Fukuoka	Respiratoty disease	AB058662
IJ-F-7	1999	Japan	Fukuoka	Unknown	AB058663
IJ-F-9	1999	Japan	Fukuoka	Unknown	AB058664
S103	2000	Japan	Kanagawa	Unknown	AB058665
Ibaraki 1	Unknown	Japan	Ibaraki	Unknown	this paper

*USA=United Staes of America

** UK=United Kingdom

Table 2 The relationships of isolates between the countries and the genogroups I and II.

Genogroup	UK	Germany	Australia and New Zealand	USA	Canada	Japan	Total
I	5(100)*	4(100)	7(100)	9(100)	5(100)	23(49)	53
II	0	0	0	0	0	24(51)	24
Total isolate per country	5	4	7	9	5	47	77

*Figures in parenhteses are percentages

Table 3 Distribution of genogroups of isolates from cats at different sampling sites.

Genogroup	Area isolated (%)			Total
	Kyushu	Kinki	Kanto	
I	7(64)	7(58)	7(33)	21
II	IIa	3(25)	6(29)	13
	IIb	0	8(38)	10
Total	11	12	21	44

Table 4 Distribution of genogroups of isolates from cats in each prefecture.

Genogroup	Prefecture Isolated								Total	
	Fukuoka	Kumamoto	Osaka	Nara	Kanagawa	Tokyo	Ibaraki	Hokkaido		
I	5	2	2	5	4	3	1	1	23	
II	IIa	4	0	3	0	5	1	0	0	13
	IIb	0	0	2	0	6	2	1	0	11
Total	9	2	7	5	15	6	2	1	47	

Table 5 The relationships of FCVs between the year of isolation and the genogroups I and II

Genogroup		Year										Total	
		1971	1989	1990	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999		2000
I		1	0	1	0	6	2	0	2	3	2	5	22
II	IIa	0	1	3	0	3	1	1	0	2	2	0	13
	IIb	0	0	1	1	0	0	1	3	4	0	0	10
Total		1	1	5	1	9	3	2	5	9	4	5	45

Table 7 Cluster and clinical signs patterns associated with the isolates

Strain	Clinical signs	Genogroup-Cluster
FPL-NCI	enteritis	I-C1
FCV-43	enteritis	I-C2
FCV-170	enteritis	IIb
LSO12	chronic stomatitis	I-C1
LSO15	chronic stomatitis	I-C4
KS20	chronic stomatitis	I-C1
KS8	acute stomatitis	I-C5
KS109	acute stomatitis	I-C2
F65	lameness	I-C4
LLK	limping	I-C3
2280	limping	I-C3
FCV-6	health	IIa
NADC	health	I-C6

Table 8 Nucleotide sequence homology(%) within the region E of FCVs in Fig.6

strain	Nucleotide			
	F9	FCV-Ari	FCV-S	H10
F9		76.4	74.5	77.9
FCV-Ari			70.4	74.7
FCV-S				70.7
H10				

Table 9 Relationships between genogroups and neutralizing antibody titers.

Genogroup	Isolate	NT titer	Mean±SD
I	FCV-5	1:179.2 ^{a)}	20.5 ± 5.5 (n = 7)
	FCV-43	1:5.6	
	ML3	1:11.2	
	ML4	1:16	
	ML7	1:64	
	S21	1:89.6	
	H10	<1:1.4	
II	H1	1:8	11.3 ± 2.6 (n = 14)
	ND35	1:2	
	FCV-2	1:32	
	FCV-6	1:89.6	
	FCV-11	1:44.8	
	FCV-2-15	1:8	
	FCV-B	1:8	
	FCv-170	1:11.2	
	ML1	1:11.2	
	ML2	1:11.2	
	ML5	1:11.2	
	ML6	1:5.6	
	S1	1:5.6	
	S2	1:8	

a) Reciprocal titer

NT) Virus neutralization test.

Table 10 Clinical history of a cat of H10 stain infectious disease.

Location	Date	Disease complex	Sex	Breed	Vaccination
Tokyo	1999,2,26	Respiratory Disease	Female	Japanese cat	Yes (1998,5,31)

Table 11 Antibody response to H10 and F9 strains in F9 vaccinated cats

Antigenic virus	No. of cat	Post-inoculation of challenge virus of H10 strain (week)				
		0	1	2	3	4
F9	1	64	179	128	179	358 ^{b)}
	2	256	357	358	358	358
	3	256	357	256	358	256
	4	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192
	5	≤2	≤2 ^{a)}	death		
	6	NT	NT	NT	≥8,192	
	7	NT	NT	NT	≥8,192	
H10	1	<2	16	45	45	32
	2	<2	229	128	90	32
	3	45	358	256	358	358
	4	90	179	256	179	179
	5	≤2	≤2	death		
	6	NT	NT	NT	≥8,192	
	7	NT	NT	NT	≥8,192	

a) 5 days post challenge

b) Reciprocal titer

NT) no test

Table 12 Clinical history of post-challenge by H10 strain

Vaccination	Cat No.	Body temperature (°C)	White blood cells/mm ³	Releasing period (day)	Disease complex
Yes	1	39.6(6) ^{a)}	21700(1)	13	fever
	2	NT	15200(1)	13	NT
	3	39.3(3)	11100(1)	7	fever
	4	39.8(5)	10900(1-2)	4	fever
No	5	40.8(3)	19600(1)	5	acute death with fever
	6	39.2(1)	11150(1),29875(8)	13	diarrhea,respiratory,fever
	7	39.1(1)	15375(1),21975(7)	13	diarrhea,respiratory,fever

NT) no test

a) days post challenge.

Table 13 Isolation of virus from two cats manifesting an exciting state and three cats with no clinical signs, and cats kept together.

Cat No.	Specimens	Viral isolation	Breed	Sex	Age	Body weight	Clinical sign	Vaccination
1	Cervical spinal cord ^{a)}	4/4 ^{d)}	Siamese	M	7yr	4.0kg	Death two days post exciting	Unknown
	Lungs	4/4						
	Tonsil	4/4						
	Large brain	-						
	Small intestine	-						
2	Ileum	3/4	Mongrel	M	4yr	3.8kg	Death two days post exciting	Yes
	Medullar oblongata ^{b)}	1/4						
	Cervical spinal cord	1/4						
3	Ocular	-	Chinchilla	M	6yr	2.4kg	No sign	Yes
	Oral ^{c)}	2/4						
	Nasal	-						
4	Ocular	-	Chinchilla	M	2yr	2.6kg	No sign	No
	Nasal	-						
5	Ocular	-	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	No sign	Unknown
	Nasal	-						

a-c) FCV-S,FCV-B,FCV-SAKURA

d) Number of viral isolation positive tubes /Number of cell tubes

M, Male ; -, Negative

Table 14 Neutralization test of isolates FCVs-S,B and SAKURA strains

Strain	Immunized cat serum	
	F9	FCV-S
FCV-S	224	1,280 ^{a)}
FCV-B	160	2,240
FCV-SAKURA	160	2,240
FCV-2	640	120
FCV-6	1,792	160
FCV-11	896	40
FCV-15	160	200
FCV-43	112	40
F9	2,560	620

a) Reciprocal titer

Table 15 Virus neutralization titers post-inoculation of FCV-S.

Vaccination		Post-inoculation of FCV-S (week)						
	No. of cat	Antigen	0	1	2	3b)	4	7
No	1	FCV-S	<40	2,560	2,560	2,560	>20,480	20,480 ^{a)}
		F9	<40	1,280	1,920	1,280	>20,480	5,120
	2	FCV-S	<40	2,560	1,280	1,280	>20,480	20,480
		F9	<40	2,560	960	640	>20,480	3,840
Yes	3	FCV-S	<40	640	5,120	5,120	5,120	5,120
		F9	160	2,560	3,840	7,680	1,200	2,400
	4	FCV-S	<40	120	3,840	5,120	5,120	2,560
		F9	224	1,280	1,280	10,240	10,240	5,120
	5	FCV-S	<40	80	960	2,560	3,840	1,280
		F9	80	240	640	960	640	320
	6	FCV-S	40	160	5,120	7,680	5,120	5,120
		F9	640	960	5,120	3,840	NT	1,600

a) Reciprocal titer NT) no test

b) Cats were challenged 3 weeks after primary challenge.

Table 16 Physicochemical characteristics of isolates FCVs-S, B SAKURA and some field FCVs

Strain	Heat stability(50°C)		pH stability		Bile sensitivity		Trypsin sensitivity	
	no heat	50min.	3.0	7.0	no bile	bile	no trypsin	trypsin
FCV-S	5.5	0.75	3.75	4.5	6.0	1.75	6.0	2.75 ^{a)}
FCV-B	6.5	0.5	4.25	5.5	6.5	2.0	6.5	2.5
FCV-SAKURA	6.5	1.0	5.25	6.0	6.5	1.75	6.5	2.5
FCV-2	5.75	2.0	2.75	5.75	6.0	3.25	6.0	5.5
FCV-11	5.0	0.5	0.5	5.75	5.5	1.5	6.5	6.5
FCV-15	4.5	0.5	0.5	4.5	NT	NT	6.5	6.5
FCV-43	NT	NT	5.5	6.5	6.5	6.5	NT	NT
F9	6.0	3.0	2.5	5.25	1.5	1.5	5.0	2.5

NT: no test a):Viral titer (Log TCID₅₀/0.1ml)

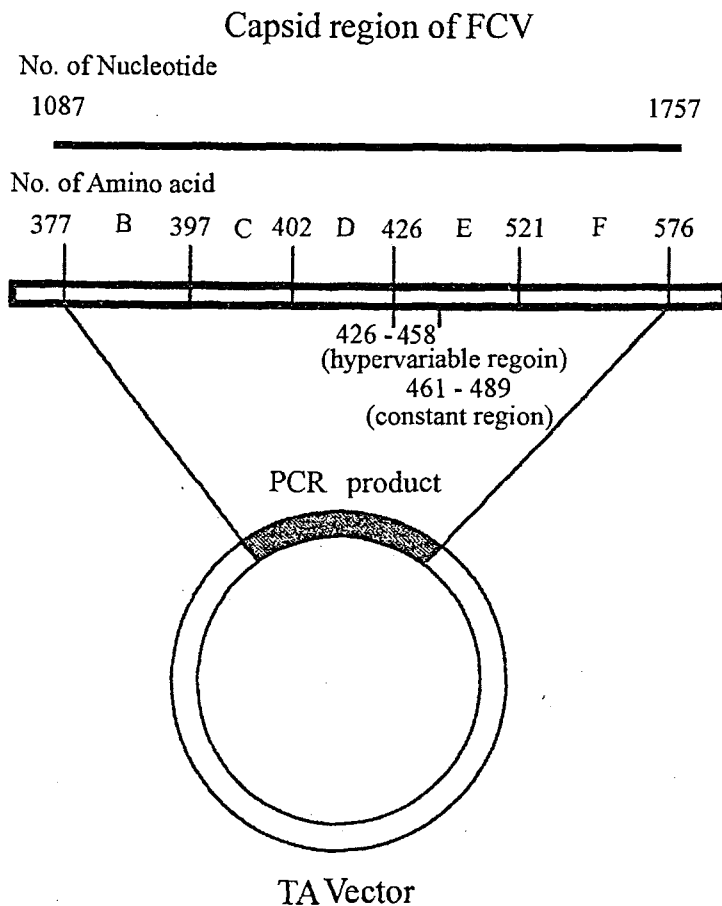


Figure 1 PCR-amplified FCV capsid region, including E hypervariable region (B-F), and TA cloning vector. C-terminal B region (amino acids 370-396), C region (amino acids 397-401), D region (amino acids 402-425), E region (amino acids 426-520) and the N-terminal F region (amino acids 521-580).

Isolate	(No. of nucleotide)		
01 V77	1	-AGGCCAACG-GCCACTTCGATTTCAATCAAGAAACGGCTGGGTGGAGCACACCAAGATTCGGCCGATCAAGTTACCATT	80
02 V83	1	A...T...T...A.....G.....A.....C.....C.T.....C.A.C.T.TA.C.T... 80	
03 ML19	1	A...-A.C.T...T.....C.G.G.C.....C.....A.A.T...C.T.A 80	
04 Urbana	1	...ATC.A.T.T.....T.....A.....C.....A.A.A.....A... 80	
05 LS012	1	A..C.A...GT.ACT..GAT..A.C...G.G.....A.....C.T...A.C.A... 80	
06 K2	1	A..CAA...T.GT.ACT..GAC..CA.T...G.G.....C.....T.T.....A.....TA.C.TT.G 80	
07 H10	1	A...A...GC.ATT..GAT...A.T...G.....A...T...T.....G.CA...C.T.CA.C.A.C 80	
08 ML12	1	...A.T.GT.ACT.CGAT..CA.T...T.....T.....A.A.A...TA.A.AC.A 80	
09 FRI-NCI	1	A...T...GT.ACT.CGAT..A.T...G.G.T...C.....C.....C.T.A.T.C.C.A... 80	
10 Bolin	1	A...T...GT.ACT.CGAT..GA.T...G.G.T...C.....C.....C.T.A.T.C.C.A... 80	
11 KS20	1	...A.T.G...ACT..GAC..A.T...G.A...C.....G.T.G...T.C...T.C.A...A 80	
12 S103	1	A...A...A.A.G.T.T...T.....C.....T.....C.....C.C.A...T... 80	
13 S21	1	...A...A.A.G.T.T...T.C.G...T.....T.....C.T.A...A... 80	
14 FCV-43	1	A...-A.-ATA.A.T.T...T...G...C...C.....C.C.A...A... 80	
15 ML3	1	A...-A.-A.A.A.T.T...T...G...C.C.T...T.G...C.A.C.A.A.C.A... 80	
16 KS109	1	A...-A...AGA...T...T...T...T...T...T...C.T.C.G...C.A.G 80	
17 ML4	1	A...-T...GT...T.C...T...T...T...T...T...C.A...TA.C.A... 80	
18 258cvs484	1	A...-A...GC.ATT..T...C.....C.....C.....T.G.C..AACCAAT..CGGTACCA 80	
19 2280	1	A...-A...GA.ACT..T...T...G...T...G...G...C...A...-TA.C.GTTACAA 78	
20 V276	1	...T.T.GC.ATT..T.C...G...G...C...T.G...A...A...-C.GTTAC.A 78	
21 V274	1	...T.T.GC.ATT..T.C...G...G...C...T.G...A...A...-C.GTTAC.A 78	
22 LLK	1	A...-A.T.GT.ACT..T...T...G...G...G.T...T.G...C.A...-C.GTTACAA 78	
23 CFI/68	1	...ATC.A...T...C...G.A.A.T...C...G...C.A.T.TA.C--AC.A 78	
24 ML7	1	A...-A.A.G.T...A.C.T...A.G.T...C...G...C.A.C.A.TA...-AC.A 78	
25 IJ-F-7	1	A...-A...A...A...T...T...T...T...A.C...T...C...A.A.T...A--A.CA 78	
26 K1	1	A...-A...A...G...T...T...C...G.T.A.C...T.C...A...A...TT...G--ACCA 78	
27 28043-87	1	A..CGA-T.GA...T.C.T...G...T...A...C...A...C.A...C.T.A 80	
28 82857-91	1	A..CGA-T.GA...T.C.T...G...T...A...C...A...C.A...C.T.A 80	
29 89243-91	1	A..CGA-T.GA...T.C.T...G...T...A...C...A...C.A...C.T.A 80	
30 LS015	1	A..CAA-T.GA...T.G...G...A.A.A...C.C...T...TA...A 80	
31 F65	1	A...A.T.GT...T...C...G.T.A.A...T...ACA...C.T.C.C.T.T.A 80	
32 182cvs5A	1	...A...GC...T...T...T...T...C.T...A...AT.A.TA.C.T.C 80	
33 ML13	1	A...-A...GT.ACT..GAC...AG.CAGGAG...T...T...A.A.A.T...C..AT.G 80	
34 FCV-255	1	A...-A...GT.ACT.CGAC..A.TCAGGAG...T...G...C.A.A...A.A.A... 80	
35 KS40	1	A...-A...G...ACT..GAC...A.TCAGGA...A...T...G...C.C.T...A.C... 80	
36 K58	1	...T...GT.ACT..GAC...A.CCA.GAG...T...T...T...G...C.T...T... 80	
37 K12	1	A..C.A.T.GAC-ATT..GAC...A.CCAGGA..CG.C.G.ATG.A...T...C.A.A.T.G.C.A...C 80	
38 A4	1	A...-T.A.C.T...T...G...G...T...T.G...A...A...TA.C.A... 80	
39 NADC	1	A...-A...A.C.G.T...A...G...T...T...G...A...A...CA.C.A...C 80	
40 JOK63	1	A...-T...ATC.G.T...A.C.TG...T...T...T.G...A...A...CA.A.A... 80	
41 K8	1	...A...A.C.T...T.C...G...C...C...G...A.A.A.T.C.A...A... 80	
42 F4	1	A..CAA--A.C.T.T...C.T.C...A...C...C...CA...C...CA...A... 80	
43 IBARAKI 1	1	A..CAA--A.C.T.T...C...A.G.G...C...C...A.A.A...CA.C.A... 80	
44 IJ-F-3	1	A..CAA-T.G-T...T...T.C.G...T...T...A.A.A.T.TA...A... 80	
45 KS	1	A..CAA-T.G-T...T...T.C.G...T...T...G...CA.A.A.T.CA.C.A... 80	
46 FS	1	A..CAA.C.GC--T...T...G...A...C...CC.T...A.A.A.CA...A... 80	
47 FPL-NCI	1	A..CAA.C.GC--T...T...G...T...A...C...C...C...C.A...A... 80	
48 KCD	1	A..CTA.C--GC.ACT...C.T...G...C...T...G...A...A...A.C.A... 80	
49 F9	1	A..CAA-T...GT.ATT...C.T...G.C.A...C...C...G...T...AT.T... 80	
50 K11	1	A...-A...GT.ACT...C...C...G.T.A.T...T...A...A.A.T.G.C.A...C 80	
51 K3	1	A...-A...GT.ATT...C...G...T.G.T...T...A...C.A...G.T.G 80	
52 FCV-5	1	A...-A...GT.ATT...C...G...G.T...T.C...A...C.T.TA.C.G... 80	
53 ML14	1	...T...GT.ACT...T.A...G...C...G...A.A.A.T.CA...A.A 80	
54 K4	1	A...-A...A.A.G...T.C...G.G...A...T...C...G...A...A.G.A.A...C 80	
55 ML1	1	A...-A...A.A.A...T.C...G.G...A...C...T.C...G...A...A.G.A.C.A...C 80	
56 K7	1	A...-A...A.A.A.T.T...T...G...T...T.C...G...CA.A.A.G...C... 80	
57 IJ-F-9	1	...A...A.A.A...T...G...G...A...C...A.A.A.G.GA.A.AT.C 80	
58 K10	1	...A...ATA.A...T...G...G...A...C...T...G...A...A.G.A.A.A...C 80	
59 IJ-F-4	1	...A...ATA.G...T...T.A...A...A...T...T...G...CA.A.A.G...A.A...C 80	
60 FCV-2	1	A..CGA--A.A.T...C...A.G...A...T...T...C.G...A.A.A...GT.T... 80	
61 FCV-1	1	A..CGA--A.A.T...C...A.G...A...T...T...C.G...A.A.A...GT.T... 80	
62 FCV-6	1	A..CGA--A.A.T...C...A.G...A...T...T...C.G...A.A.A...GT.T... 80	
63 FCV-11	1	A..CGA--A.A.T...C...A.G...A...T...T...C.G...A.A.A...GT.T... 80	
64 H17	1	A..C.A--A.G.T.T.C...G.G...A.G.C...TT.C.CC.G...A.A.T.A.C.T.C 80	
65 IJ-F-5	1	A..CAA--TA.G.T.T...G...G...G.A.A.C...C.C...A...AT.G...G... 80	
66 K9	1	A..CAA--A.G...T...A...A...A...T...C...CA...AC...G.T.C 80	
67 FCV-15	1	A...-ATA.G.T.T.C...A.G...T.C.A...T.C.T.G...A...C.G.G...A...C 80	
68 FCV-170	1	A...-ATA.G.T.T.C...A.G...T.C.A...T.C.T.G...A...C.G.G...A...C 80	
69 H1	1	...ATA.G.T.T...A.G...T.A...T.C.T.G...A...T.G.GG...A...C 80	
70 ML2	1	...ATA.G.T.T...A.G...T.A...T.C.T.G...A...T.G.GG...A...C 80	
71 ML6	1	...ATA.G.T.T...A.G...T.A...T.C.T.G...A...T.G.GG...A...C 80	
72 ML5	1	...ATA.G.T.T...A.G...T.A...T.C.T.G...A...T.G.GG...A...C 80	
73 FCV-B	1	A...-TA-A...T.C...G.G.G.T.A.A...C.C...A.A.T.G.GG...A...C 80	
74 S1	1	A...-A...A...G...T.C...G...T.A.A...C.C.G.CA.A.C.G.GGA... 80	
75 S2	1	A...-A...A...G...T.C...G...T.A.A...C.C.G.CA.A.C.G.GGA... 80	
76 ND35	1	A...-A...A...G...T.C...G...T.A.A...C.C.G.CA.A.C.G.GGA... 80	
77 TOKYO 1	1	A...-A...A...G...T.C...G...T.A.A...C.C.G.CA.A.C.G.GGA... 80	

Figure 2 Comparative nucleotide sequence (1105-1739) analysis of capsid protein of FCVs in Table 1. ★=Identical nucleotide.

01	V77	243	GCTTACGATGCAGCCGATGTCATCAAAAAAGATACCAACTTCAGGGGTATGTACATCTGTGGTCTCTCCAACGTGCTGGG	324
02	V83	243CA.C.A.....T.G.TA.....A.....T.T.....G.A.....G.....G.....	324
03	ML19	243	CAG..T...G...T...A..T..G..A...T.....G.....T.....C...T...A.A.A...	324
04	Urbana	243	CAG..T...T...CA.A..T..G...A.C..T.....A..C...T.....A.A...A.A.G...	324
05	LS012	243	AG..T...T..T...TG.T.G...A.C.A..T..T.....T.....G.A.T.A...A.A.A...	324
06	K2	243	GG..T..C..T..T.CC..G..A..G..A.C.A..T..C.T.A...T.....CT.G...G.....	324
07	H10	243	AA...CAGC..T...AA...G...ACA..A...TC...A...CG.G..G..GA.G...	324
08	ML12	243	CAG..T...A.T.T...AA...C...ACC.A...TC...A...T...A...T.G...A.A.C...	324
09	FRI-NCI	243	GC...CA.T.G...T.GG..TACC..AG.G...C...T...AG.AT.G...A.G...	324
10	Bolin	243	..C...CA.T.G...T.GG..TACC..AG.G...C...T...AG.AT.G...A.G...	324
11	KS20	243	AC...GT...T...G...ACC.G.T...C...T...C.G...A.A.A...	324
12	S103	243	AG...CA...TACCA...GG...A.C.TG.A...A.C...T...A.A...A.G.C...	324
13	S21	243	G...T.CAGT..T...A...T.G...A...T.T.AA.C...C...G.A...A.A.A...	324
14	FCV-43	243	AA...CT.G.T...ACT...C.G...C...C...T...C...T...A.A.A...	324
15	ML3	243	AG...T...AG...A.A..T..G..A...T.....T.....A..T...A.A...	324
16	KS109	243	GG..T..CA.T.T..CA.A..T..GG..A...T..A...T...G..T...A.A...	324
17	ML4	243	CAA.TT.CAGT..A...AG..A..G..A.C.A...A..G...A..T...A.G.C...	324
18	258cvs484	245	A...C...T...T.G...A.C..T...A...T...A...T.A.G.A...	326
19	2280	243	AA...CCAT..T...AA...A.C.A...T.AAA...A..AT.G...A.A.C...	324
20	V276	243	A..T..C..G..T...T..G..TA.C...T...A..A...T...C..A...A.A.A...	324
21	V274	243	A..T..C..G..T...T..G..TA.C...T...A..A...T...C..A...A.A.A...	324
22	LLK	243	AAA..T..CATT.A...AAGG.T.CC.TA.C.T.T.T.AAA.C...GC..G..GA.A...	324
23	CFI/68	243	CAG...T...AC..AG..T.G...A.C...T...A..C...T...T...A.A...	324
24	ML7	243	A...T...AAT.T.G...G...A.C..T..T...A..C...T...G..A...A.G...	324
25	IJ-F-7	243	AG...C..T...C...C...A.C.A..T..T.A.G...G..C...A.A.A...	324
26	K1	243	GG..T..A.C.T..CA.A..T...A...A..T..T.A.G...G...GA.A...	324
27	28043-87	243	A...T...T.G.T...G..T...T...A..T..T.AAA.C...AG..T.GG.GA.A...	324
28	82857-91	243	A...T...T.G.T...G..T...T...A..T..T.AAA.C...AC..T.G.GA.A...	324
29	89243-91	243	A...T...T.G.T...G..T...T...A..T..T.AAA.C...AG..T.T.GA.A...	324
30	LS015	243	AA..T...T...T...G...G...A.C...T..T..AA...T...G..T.G...A.A...	324
31	F65	243	CAA...T...A.G..AA..TGT...A...T..T.AAA.C...AG.A...A.G...	324
32	182cvs5A	243	AA...A..T..ATC..AA..T...TA.C...T...AAA.C...T...G..A..T..A.A.G...	324
33	ML13	243	T.G..T...CT.TAC.ACA..A..T...ACC..A...C...C...G...C..G..A.A...	324
34	FCV-255	243	A...T...T.G...AC...A..TC...A...T...AA...T...A..T.A.GA.A.C...	324
35	KS40	243	G...T...T..T...AAA..T...C...A..T...AA...T...C..G...GA.A...	324
36	KS8	243	AG...AT...T...AA...G..TA...T..T.A..G...T...G..G..GA.A.A...	324
37	K12	243	G...T...AAGT..T.CCA..T.G...TCA..A..T..T.AA...T...C..C...GA.A.C...	324
38	A4	243	TA..T...T.G...A.C..G...A...G...A...T...G..C.G...A.A.A...	324
39	NADC	243	AA...T..GA.T.A.A.A..G..A...A..T...C...T...C..A..A.A.C...	324
40	JOK63	243	A...T...T.A..G...T...TACC...T...A..A...CT...G..A...A.G...	324
41	K8	243	A...T...T...G...ACC..A..T...C...G...A...G...T.A.GA.A.A...	324
42	F4	243	C..T..CA.T.A.C...GG.A..G...ACC..A..T...C.A..G...T...AT.G...G...	324
43	IBARAKI 1	243	AA.TT...AAG..AA...A.A.G..TA.C..A...G...T...CT.A...A.A.C...	324
44	IJ-F-3	243	C...T...G...G..T...A.C..A..T..T...C...T...CT.A..GA.G...	324
45	K5	243	C...T...T...G..A..G..TA.C..A..T..T...T...CT.G..GA.G...	324
46	FS	243	A...T...T...G...G..TA.C..A..T..C...C...T...T.G.G.A.G...	324
47	FPL-NCI	243	GG.TT.G.T.T.A.A..T...TA...A..G...C...C..T...A.G...	324
48	KCD	243	GA...T...T.CAC...A.C...T...A..A...TG.T...A.G.T...A.G.A...	324
49	F9	243	GA..T..CA.T.T..A.A..T..G..A...T...C...A...G...G...C...	324
50	K11	243	G...T...T..T...A..T...AC...T...C...T...A...G..A.C...	324
51	K3	243	G...T...T...G...A.C...T...C...T...T...T...A...G...C...	324
52	FCV-5	243	CAG.T...CA...A.C.AA..A..G..A.C..A..T..C...G...T...A..CT.A.GA.A.C...	324
53	ML14	243	CAG..T..CA..T...AGC...A..G..T...A...C...G...A..A.G...	324
54	K4	243	AG..T...T..AACCA.G...C..A..T...A.A.C...G..C..G...G.C...	324
55	ML1	243	C...A..T..AACATCA..T.C...A.C..A..T...A.A.C...CG...G..A.A.C...	324
56	K7	243	CAA..T...T..AAC..AG..T.T..TA...A...A.C...T...C...T...A.A.C...	324
57	IJ-F-9	243	CAA..T...CAGT..AAC..AA..T.GG..A.C..A..T...A.A...T...G.C.T...A.A...	324
58	K10	243	CAG..T..CAGT..AAC..AA..T.TT..TA.C.G..T...C...G...CG...A.G...	324
59	IJ-F-4	243	GA.TT.CAAT..AACCA..TA...A..T...C...T...G.C.T.GA.A...	324
60	FCV-2	243	CAA..T...T..AATCAAA..T.C...TA.C..A..T..T.AA.C...T...G.C.A..G...	324
61	FCV-1	243	CAA..T...T..AATCAAA..T.C...TA.C..A..T..T.AA.C...T...G.C.A..G...	324
62	FCV-6	243	CAA..T...T..AATCAAA..T.C...TA.C..A..T..T.AA.C...T...G.C.A..G...	324
63	FCV-11	243	CAA..T...T..AATCAAA..T.C...TA.C..A..T..T.AA.C...T...G.C.A..A...	324
64	H17	243	AAG..T..C..C..AACCA.AA..T.GG..A..A...T..AA.C...T...C..G...A...	324
65	IJ-F-5	243	AG...T...C..T..AACCAAG...C...A.C..A..T..T.AAA...T..T...CG...G...	324
66	K9	243	GG...C.G..A...A..TGT..TA.C..A..T...G.C.T...A.C...	324
67	FCV-15	243	AA..T..C...AC.TC...TC..A..A..T..T.AAA...A...G.C.T...A.A...	324
68	FCV-170	243	AA..T..C...AC.TC...TC..A..A..T..T.AAA...A...G.C.T...A.A...	324
69	H1	243	CAA.TT.CAGC..ACCACA..GTC..TA..A...AAA.C...A...G...T.G..A...	324
70	ML2	243	CAA.TT.CAGC..ACCACA..GTC..TA..A...AAA.C...A...G...T.G..A...	324
71	ML6	243	CAA.TT.CAGC..ACCACA..GTC..TA..A...AAA.C...A...G...T.G..A...	324
72	ML5	243	CAA.TT.CAGC..ACCACA..GTC..TA..A...AAA.C...A...G...T.G..A...	324
73	FCV-B	243	CAG...CAGC..ACC.AA...G...A.C.A...T.A.A...G...T.G...G...	324
74	S1	243	A...T...ACC.AA...G...A...AAA.C...T..A...G.C.T...A...	324
75	S2	243	A...T...ACC.AA...G...A...AAA.C...T..A...G.C.T...A...	324
76	ND35	243	A...T...ACC.AA...G...A...AAA.C...T..A...G.C.T...A...	324
77	TOKYO 1	243	A...T...ACC.AA...G...A...AAA.C...T..A...G.C.T...A... 324	

Figure 2 continued

01 V77	325 GAGACAAGAAAATCAAACACTGCTTTCATCACAAACGGCAACGGTTGCTAATAACAAAATTTTCCAGCAACACCA---T	403
02 V83	325	403
03 ML19	325 .T.....C.....T.T.T.T.T.GATT.AAAAG.C.CG..C.C.A.CA.GCC..G..ATGTGA.	406
04 Urbana	325 .T.T.....T.C.....C.C.C.....AGGG..TG.TC.AA.C.....GT.ATGTTA.	403
05 LS012	325 .T.....C.G.C.....GT.A.....A.C.T.....TTAGG.A.GGAGC.....AAG.GT---CA.AT.CCA.	403
06 K2	325 .T.....C.....C.....C.T.T.TAGG.AC..A..TCC....CG..GT---C..AT.CAA.	403
07 H10	325 .T.....T.GGC..C.A.T.A.C.T.....TCAAA.AAGGC..T.....AAA..AT---CT.A..CTA.	403
08 ML12	325 .T.....A.G.....C.....C.T.A.C.A..TGTCAAAA.CGGG.....T.GAGC.AT---CA.ATGTTA.	403
09 FRI-NCI	325 .C.....T.....GCT.....C.T.....C.C.TTGTAAAG.ACGBA---C.A.A.CA.ACCATC..ATGTGA.	403
10 Bolin	325 .C.....T.....GCT.....C.T.....C.C.TGTTAAAG.GCGGA---C.A.A.CA.ACCATC..ATGTGA.	403
11 KS20	325 .T.....G.C.....A.....C.C.C.CA..AAGGG.G.A..CAA..GGAACC.TCA.AT.CTA.	406
12 S103	325 .C.T.....G.T.....T.....T.T.G.GTTA..AAG.....CGC.AAGC..T.....GT..TC--	404
13 S21	325 .T.....A.G.C.....T.....T.....T.T.G..TT..AA.GG..C.....C.G.A..T..T..TGT..TT--	404
14 FCV-43	325 .C.T.....G.T.....C.....C.G..TT..GAAAGGAGGA.TGG.GCAG..T..T..GT..TT--	404
15 ML3	325 .C.T.....G.C.....C.....G.C.G..C.....AGGGAGG.....C.AA.A..T..TG.GGT..TC--	404
16 KS109	325 .T.T.....T.....T.....T.....T.G..TT..AAGGA..T..GT.GAAA..A.....TGT..TTGA	406
17 ML4	325 .T.T.A.G.C.....T.....T.C.T.GT..A..AGGG..T..C..CAG..TTCT..TGTG.TTGA	406
18 258cvs484	327	408
19 2280	325 .T.T.....T.T.....C.T.....C.A..GTCAAG.AAGG.....GC..CACA..GTCT.....A.TTGA	406
20 V276	325 .G.T.A.G..T.T.....T.T.....T.T..TAT.GAAGG.....C.....GAA..A..T.TA.TAGA	406
21 V274	325 .G.T.A.G..T.T.....T.T.....T.T..TAT.GAAGG.....C.....GAA..A..T.TA.TAGA	406
22 LLK	325	406
23 CFI/68	325 .G.T.....G.T.....T.....T.....C.GC.....A.GGAGC.....T.GA.A..T..T..TTGA	406
24 ML7	325 .G.T.....G.C.....T.....T.C.C.GG..T..CAAGGGG..G.CC.GC..T.....GT..TTGA	406
25 IJ-F-7	325 .G.T.....G.C.C.....T.....C.C.....A.C.A.GG.....G.CT.GA..AT.....TAGA	406
26 K1	325 .C.....G.C.C.....G.C.T.....C.C.....AAGG.....T.GG.G..TT.T.....TAGA	406
27 28043-87	325 .T.T.....C.....T.....A.C.CC.TGG..G.A..CC.C.....C.CAAG.....T.....A.TTGA	406
28 82857-91	325 .T.T.....C.....TC.....A.C.C.TG..G.G..C.C.....C.CAAG.....T.....A.TTGA	406
29 89243-91	325 .T.T.....C.....T.....A.C.C.TG..G.A..C.C.....C.CAAG.....T.....A.TTGA	406
30 LS015	325 .T.....C.....A.C.T.CT.A..AAG.GGC.....C..GAA..T..T.....A.TTGA	406
31 F65	325 .T.....GG.T.....TG.A..T..C.....AA.AGG.....C.C.AAA.....A.TTGA	406
32 182cvs5A	325 .T.....G.C.....G.C.....T.T.C.T.TA..AA.GGG.G..G..AA.C..G.....GT.TTGA	406
33 ML13	325 .T.T.....G.C.....C.....A.C.T.C.T..GAA.GG.....G..GAG..ATCT.....A-----	401
34 FCV-255	325 .T.T.....C.A.T.T.T.TC..CAGGAG.G.C.....C..ACA..ATC..TGTG-----	401
35 KS40	325 .T.....A.G.....T.A.....C.A.T.....A.G.A..G..T.A.ACA.TA.CACCAT.A.ATG.	406
36 KS8	325 .T.....T.C.....C.....T.A.C.T.C.A..A.....T-----TA.TACC.T.A.ATG.	400
37 K12	325 .T.....T.T.T.....G.A.T.A.C.T.C.T.....ACG.A..TTCT.....C.T.....G.TTGA	406
38 A4	325 .T.....G.T.T.....A.....T.T.C.TCAAGAAAGGG.....T..AAA..ATCA.....A.TTGA	406
39 NADC	325 .T.T.....T.T.....T.A.C.T.....TTAAG.AAGG..T..G..AGA..ATCA..T..A.TTGA	406
40 JOK63	325 .T.T.....T.....GT.A.G.T.....C.T.C.TTAGG.AA.....T.G..A.A..AT.....G.TTGA	406
41 K8	325 .T.....G.C.....T.....C.A.C.C.....TTAAG.AA..C.T.....AAG..ATC..T.TA.TTGA	406
42 F4	325 .C.T.....G.T.....T.....C.A.C.C.C.TCAGG.ACGBG..G.....CAAA..ATCT.....A.TTGA	406
43 IBARAKI 1	325 .C.T.....G.T.....C.C.....A.C.T.C..CAAGAAAG.C.....GT..GAG..ATC.....A.TTGA	406
44 IJ-F-3	325 .T.....A.G.C.T.T.....A.T.A.T.T.C..TAGG.ACGBG.....CAAA..ATC.....A.TTGA	406
45 K5	325 .C.T.A.G.C.T.....A.A.C.T.C.TTAGA.AACG.G.....CAAG..ATC.....A.TTGA	406
46 F5	325 .T.....G.T.C.....C.....T.T..GGTAAGGATA.CC.....C.CAAA..GTCT..TGTG.TAGA	406
47 FPL-NCI	325 .T.....A.G.C.C.....A.A.....C.T.GG.TAA..AAAG.CG..GC.AAGC.....TGTG.TAGA	406
48 KCD	325 .T.....G.T.G.....T.....T.A.....GAAA..C.....ACAACTT..AC..GCAA	397
49 F9	325 .T.T.....T.C.....C.T.....C.T.C..CC.A.A.GG.G..T.C..ACAACAAG.T..TC..TGTAA	406
50 K11	325 .T.T.....T.C.....A.....T.....T.G..A..AAG.C.....T.C.A.GCAA	397
51 K3	325 .T.T.....T.T.....A.T.....C.T.G..A..T.GG.A..TG.T.AC.CAAT..---CTC.T.ACAA	403
52 FCV-5	325 .T.T.....G.T.G.....T.....T.C.T.GTAAAGAAAGG.....CGC.....GC.ATCCAA	397
53 ML14	325 .T.T.G.....T.....A.C.T.TTAGA.A.GGG.....C.C.....AC.GTCCAA	397
54 K4	325 .T.T.....G.G..T.....C.A..A.C.T.....AC.GAAAGGC.....A.C.A.T..TGTG.TTGA	406
55 ML1	325 .T.T.....G.G.C.....C.A.....A.C.T.G.GA.T.GAAGGG.....TC....AGC..A.....TGTG.TTGA	406
56 K7	325 .T.....G.....C.A..G.A.C.T.....AT.AAAGCGA..CGT..C.....GT.T..TGTG.TCGA	406
57 IJ-F-9	325 .T.T.....G.C.....C.A..G.A.C.T..G.ATC.G.ACG.A.T.....ACC..ATCG..TGTG.TCAA	406
58 K10	325 .T.....C.....C.A..A.C.....CGATC.G.G.G.A.....CACC..GTCA..T.TA.TCAA	406
59 IJ-F-4	325 .T.T.....G.....C.A.T.A.C.....TGACT.GAAGCGG..G.....AC..ATCA..TGTG.TTAA	406
60 FCV-2	325 .T.....C.....C.....A.T.....AC..AC..C.....G.A.....A.....TGTG.TTGA	406
61 FCV-1	325 .T.....C.....C.....A.T.....AC..AC..C.....G.A.....A.....TGTG.TTGA	406
62 FCV-6	325 .T.....C.....C.....A.C.....AC..AC..C.....G.A.....A.....TGTG.TTGA	406
63 FCV-11	325 .T.....C.....C.....A.T.....AC..AC..C.....G.A.....A.....TGTG.TTGA	406
64 H17	325 .T.....G.C.....C.T.A.T.A..T.AT.G.A.GG.....C.A.T..TT.TTGA	406
65 IJ-F-5	325 .T.T.....G.T.....T.....C.C.A.C.A.....TC.AT..GGC.....AA.C.....T.T.T.TTGG	406
66 K9	325 .T.T.....GG.....GC.T.....C.T.GT..TC.G.A..A.C..GT..AA.C.A.T.....TTGA	406
67 FCV-15	325 .T.....C.....A.....A.T.T.GG..T..AG.....T.G..CC..TTC.....A.TAGA	406
68 FCV-170	325 .T.....C.....A.....A.T.T.GG..T..AG.....T.G..CC..TTC.....A.TAGA	406
69 H1	325 .T.....C.....A.T.....C.T.G.TTA.CA.....TGCT..AACCA..TTC.....A.TCGA	406
70 ML2	325 .T.....C.....A.T.....C.T.G.TTA.CA.....TGCT..AACCA..TTC.....A.TCGA	406
71 ML6	325 .T.....C.....A.T.....C.T.G.TTA.CA.....TGCT..AACCA..TTC.....A.TCGA	406
72 ML5	325 .T.....C.....A.T.....C.T.G.TTA.CA.....TGCT..AACCA..TTC.....A.TCGA	406
73 FCV-B	325 .T.T.....T.....A.TG.G..G.C.GG..TC..A.GGG..TTCC..C.....TTC.....A.TTGA	406
74 S1	325 .T.T.....G.C.....T.....A.TG.G..C.T.G.GTTA..AAGG.TCA..G..AAAA..ATC.....G.TTGA	406
75 S2	325 .T.T.....G.C.....T.....A.TG.G..C.T.G.GTTA..AAGG.TCA..G..AAAA..ATC.....G.TTGA	406
76 ND35	325 .T.T.....G.C.....T.....A.TG.G..C.T.G.GTTA..AAGG.TCA..G..AAAA..ATC.....G.TTGA	406
77 TOKYO 1	325 .T.T.....G.C.....T.....A.TG.G..C.T.G.GTTA..AAGG.TCA..G..AAAA..ATC.....G.TTGA	406

Figure 2 continued

01	V77	404	TGACCAGACAAAGAATGCCGTG-----TCCAAGATAACCATGTTGGAAAAGATGCCAGACATCAGACGATACGCTAGCC	479
02	V83	404	C....CC..C..A.TC.....T..G..C....C..AAACCTT..C....A.....T..C..A..G...	479
03	ML19	407	.G..CT..T..A.T..T..A.C.....T..G.....C..GAAT..T..A..G..A..T.....T..C..A.....A	482
04	Urbana	404A..T..A.T.....A.T.....C.....C..CA.G.T..A.....A..C.....T..C.....T...	479
05	LS012	404	C..TGC..G...T.....ACC-----G...CA.....C.....C..G..A.....C..T..C..AT...T	479
06	K2	404	...AT...ACTC..T...ATC-----G...C.A.C..GC.G..C..G..T..A.....C..T..C..AT...T	479
07	H10	404	...AT...T.....T.....ACC-----G..C.CA..C..G..T..CAG...A.....T..T..C.....T..C	479
08	ML12	404	A..TAT...T..ACTG..T...ACC-----C..C.....GAAT..G...A..T..A.....T..T.....T..C	479
09	FRI-NCI	404A..C..A.T..TT...ATC-----CT.....AAGC..T..A.....A.....T..T.....A...C	479
10	Bolin	404	...T..AC.C..A.T..TT...ATC-----CT.....AAGC..T..A.....A.....T..T.....A...C	479
11	KS20	407	C....A.....ACTC..A.A.TCC-----G.....G...T..C..A..A..A..T.....T..C.....G..T	482
12	S103	405	---A.....TC..A..A.....G..C.CA...CCAACG.GAG...A..T..T..T..C..C..T..C	479
13	S21	405	---T..A.....T...T.....G..C.C..C.CAAAC.T..CCC..A..T..T.....C..G..C	479
14	FCV-43	405	---A.....T...G.....C.CT...CC..TT..T..C.....A..T..T.....C..G..T	479
15	ML3	405	---A.....TC..G.....T.....C..C..C..C..T..G.....C..T..T.....C..T..T	479
16	KS109	407	.C..AT...A..T...A.A.A.....G..C.C...CCAATG...A.....C..T..T..C..A...C	479
17	ML4	407	.CCAA---A..T...T.....C.C..C..C.A..G..AAC..A.....C..T..C.....A	479
18	258cvs484	409	CC.ATCA..A..TCGGC.TTT.CC-----G.....G..AG.C.A...G..A.....T..T..TC...G..T	481
19	2280	407	CATGACT.AGCTTGT...TGTACC-----G..GCT..C..G..C..T...G..A..T..C..T..C..T..A	479
20	V276	407	.CCTACA.AGTT.GT..TAT.TC-----C..T..C..AAGG..A.....A..G.....T..C..AT.G..C	479
21	V274	407	.CCTACA.AGTT.GT..TAT.TC-----C..T..C..AAG..A.....A..G.....T..C..AT.G..C	479
22	LLK	407	.C.AACT..A..TTGC.ATATAC-----G...T.....AAT...A.....A..T..T..C..TT...T	479
23	CFI/68	407	CC.AACA..A..TTGCC.TAT.CC-----C.CA...CGAAT..GC.....C..G...C..AT.G..C	479
24	ML7	407	CC.AACA.AG.TTGGC.TGT.TC-----C..C...CCAAC.GC..A..T..A..C..T..T..C..AT.G..T	479
25	I3-F-7	407	.C.AACC..A..TTGCAATGT.TC-----T..C.CA..C..C..GT..A.....C..G..T..TA..A...A	479
26	K1	407	.C.GACC..A..TTGCAATGT.CC-----T..C.CA..C..CACC.CC.CCA..A...T..T..T..TC..AT.G..A	479
27	28043-87	407	.CC..CA.AG.TTGCA.TAT.CC-----C..T.....AAACGCT..A...A..C..G..T..TC..TT...T	479
28	82857-91	407	.CC.ACA.AG.TTGCA.TAT.CC-----C..T.....AAACGCT..A...A..C..G..T..TC..TT...T	479
29	89243-91	407	.CC.ACA.AG.TTGCA.TAT.CC-----C..T.....AAACGCT..A...A..C..G..T..TC..TT...T	479
30	LS015	407	.AGTACA.AG.TTGC..TGT.CA-----G..C..C...AATCGT...G..A..C..G..T..T..A..G..T	479
31	F65	407	CA..AC..A..TTGC.ATATATC-----C..T.....CAAT.GT...G..A..C..T..T..AT.GT.C	479
32	182cvs5A	407	.C.AACA.AG.TTGCA.TAT.TC-----G..C.....AAC..CAG..A..A.....TAT..AT.T..T	479
33	ML13	402	-ATTG.C.TG.CC..GATT.CAATCTTCCAAG.TACC-----GAA..C..A..T..A..G..T.....G..C	479
34	FCV-255	402	-ATAG.CC.C.CC..GATT.CTGTGTACCAGG.CACC-----G..CGGA..A..G..A...T.....C..TT.G..C	479
35	KS40	407	.ATTG.CAATCA..GATT.CTGTGTTCAAG.CA-----GAATCTT...G...T..G..T...A..T..A	485
36	KS8	401	GATTG.CCAT.CC..GAT..CTGTGTTCCAAG.CA-----C..A..TGTG..C..A..A...T..T..C..T..A	479
37	K12	407	.C.GAC..A..TTGCAAT.T.TCAAGACAAT-----C.....T.G...G..G..A...CA.T.T...G..A	479
38	A4	407	CATGACC.A---ACTC.....A.....C..C..C..CC.T...G..A..G..C..T..C...G..C	479
39	NADC	407	CATGAC..A---A.T...T..C.....AT.....C.....G..TG...A..A..T...T..CG.A..C..C	479
40	JOK63	407	CATGACA.A---A.T...T...---A..G..C.....T.GT...G..A...T...C..A...C	479
41	K8	407	CATGACT.A---ACT...T..T...---A..G..CT.....G.C...G..A..C..C...C..AT.G..C	479
42	F4	407	CATGACA.A---CTC.....CT.....A.AGC.G..A.....T..T..C...T..C	479
43	IBARAKI 1	407	CATGACA.A---ACTC..T.....A..G..C..CT.....G.....T..A...T..T...A...C	479
44	I3-F-3	407	CATTACC.A---A..T..TT.....A..G..C..C...G..C...A..T..A..G..T..T..C..A..G..T	479
45	K5	407	CATTACT.A---ACT...A.....A..G..C...G..T...A..C..A..G..T..T..C..A..G..T	479
46	FS	407	.ATG.CA..A.C.TTG---A..C.....C.CA...G.CC...GACT..A..C..T..T..C..A..G..C	479
47	FPL-NCI	407	CC.A.CA.AG.TTG---G.....T.....CA..ACCACT.T...A..T..A.....T..C..C..G..A	479
48	KCD	398	.ATGATCGACC.A.CCAAGA.CGCTGTAT.T...C.....C..CG.TA..A..T..T..T...C..AT.G..A	479
49	F9	407	.AC.ATAGACC..TCAAAGA.CGTCGTGT.T...C.....G.A..A.CG..A..C.....AT.G..C	488
50	K11	398	.AC.ATAGATC...CCAAAA.TGCAATAT..G..C..CT...C.AATCGT...A..G..G...C...G..T	479
51	K3	404	CAC.ATAGATC.T.CCAAAA.TGCAATAT...CA.....AA.C.G..A..T..A.....T...TT.G..T	485
52	FCV-5	398	CACAATTGAC.T..CAAAAA.TGCTGTGT...G...CT..C..A.G...A..T..A..G..T...C...G..T	479
53	ML14	398	.ACAAATCGAT.TATCAAAGA.TGCTGTGT.T..G..C..CT...G..TGCT..C..G.....T..T..C..AT.G..C	479
54	K4	407	CCCAAGC.A..TTGTG.TTT.CC-----G..C.....CC.....A.....C..T..TA..TT.G..T	479
55	ML1	407	CC.AA.T..A..TT.TA.TGTATC-----G..C..T.....T.TGC.A.....G..C..T..T..TT.G..C	479
56	K7	407	CC.AA.T..A..TTGTG.TGTACC-----G.....C...AA.G.TC.A...A...CA..TC..TT.G..T	479
57	I3-F-9	407	CC.AAGT.GG.TTGTG.TTTACC-----G.....AATG.TC.A.....C..A..T..TC..T..G..C	479
58	K10	407	.C.AAGT.G..TTGTG.TGT.TC-----G..C.....CAACC.CA.C...A..C..A..T..T..C...T	479
59	I3-F-4	407	.C.GAGT.G..TTGTG.TGT.CC-----C.....GAAC..G...A..T..A..T..C...G..C	479
60	FCV-2	407	.C.AA.C..A..TT.T..TTT.CC-----G..C...C..G..G.C.CGA...A...T..T.TG..T..G..T	479
61	FCV-1	407	.C.AA.C..A..TT.T..TTT.CC-----G..C...C..G...C.GA...A...T..T.TG..T..G..T	479
62	FCV-6	407	.C.AA.C..A..TT.T..TTT.CC-----G..C...C..G...C.GA...A...T..T.TG..T..G..T	479
63	FCV-11	407	.C.AA.C..A..TT.T..TTT.CC-----G..C...C..G...C.GA...A...T..T.TG..T..G..T	479
64	H17	407	CC.AACA.A.GTC.T...T.TC-----G..C.....CAA.G...A...A.....TA..TT.G..C	479
65	I3-F-5	407	.C.AG.T.AG.TTGT..T.T.CC-----G.....GAAC.GT..A..T..A..C..T..T..TA..C..G..C	479
66	K9	407	.C.A..C..A..TT.TA.TGT.CC-----G.....AAA.GCG..C..G..A..C..T..T..T..G..GC	479
67	FCV-15	407	.C.GACA.A..TTGTAAT.T.TC-----G..C..T..C..CAA.GCT...T...G..T..T..TC..C..G..A	479
68	FCV-170	407	.C.GACA.A..TTGTAAT.T.TC-----G..C..T..C..CAA.GCT...T...G..T..T..TC..C..G..A	479
69	H1	407	CC.AACA.AG.TTGT..T.T.TC-----G..C...C...AATTG.A...A...T..T..T..C..G..A	479
70	ML2	407	CC.AACA.AG.TTGT..T.T.TC-----G..C...C...AATTG.A...A...T.GATGTTA..C..G..A	479
71	ML6	407	CC.AACA.AG.TTGT..T.T.TC-----G..C...C...AATTG.A...A...T..T..T..CT.G..A	479
72	ML5	407	CC.AACA.AG.TTGT..T.T.TC-----G..C...C...AATTG.A...A...T..T..T..CT.G..A	479
73	FCV-B	407	CC.AACA.A..TT.TA.TTT.CC-----G..C..T..C..CAA.GCT..A..T..A...T..TC..AT.G..A	479
74	S1	407	.C.AACA.AG.TTGTG.T.T.CC-----CAAT.GT..A...A...T...TC..AT.G..A	479
75	S2	407	.C.AACA.AG.TTGTG.T.T.CC-----CAAT.GT..A...A...T...TC..AT.G..A	479
76	ND35	407	.C.AACA.AG.TTGTG.T.T.CC-----CAAT.GT..A...A...T...TC..AT.G..A	479
77	TOKYO 1	407	.C.AACA.AG.TTGTG.T.T.CC-----CAAT.GT..A...A...T...TC..AT.G..A	479

Figure 2 continued

01	V77	480	CTCCTTGGGTACACTGGGATTGGCGAAGGCGATCGGTGCCGATAGGGACAGGGTAGTGGCCATTAGCATTCTGCCGAGA	561
02	V83	480C.....A.G.G.A.T.....T.C.....G.A.T.....G.G.....A	561
03	ML19	483	CT.....A.....A.T.....T.G.....TG.T.G.....C.....A.G.A.....G.A.....T.A	564
04	Urbana	480G.....C.....A.....T.....G.....C.....T.....TA.....A.....C.....C.....G.....T.....A	561
05	LS012	480	A.T.C.C.....C.C.....T.GC.....A.T.GT.T.CC.....T.....G.....G.....G.....A.....A	561
06	K2	480	T.AT.A.C.....A.....T.GG.....A.T.AT.T.C.A.....G.....A.C.G.GT.....G.....	561
07	H10	480G.....A.....A.....A.....T.....CT.TA.C.A.....A.G.....C.TG.G.....A.G	561
08	ML12	480A.....T.T.C.A.....T.....C.T.A.T.....T.A.....A.T.A.G.....T.G.G.....A.....	561
09	FRI-NCI	480T.T.....A.....T.G.C.C.A.T.GT.G.....T.....T.....A.C.....CA.T.T.A	561
10	Bolin	480T.T.....A.....T.G.C.....A.T.GT.G.....T.....T.....A.C.....CA.T.T.A	561
11	KS20	483A.....G.....CA.....T.....C.A.T.AT.AA.....A.....AA.T.....T.G.....T.T.AG	564
12	S103	480G.....T.....A.A.....T.G.G.A.T.G.T.C.....A.....C.....G.A.T.T.A	561
13	S21	480	T.A.....C.....G.A.....A.G.....A.T.A.T.....T.....T.....C.G.A.C.T.AG	561
14	FCV-43	480A.....C.T.A.A.....T.....GGC.....T.GT.....C.....T.....T.....G.G.T.....AG	561
15	ML3	480	T.G.C.C.T.C.....T.T.C.....A.T.A.....CC.AA.T.....C.....T.G.A.T.T.AG	561
16	KS109	480	T.A.....T.T.....A.....T.G.G.A.T.AT.T.....A.....AA.T.....C.....G.....C.A.G	561
17	ML4	480T.T.A.A.....A.....T.GC.G.A.T.AT.A.....A.T.A.....T.....G.G.C.....	561
18	258cvs484	482	T.G.....A.....A.C.T.....A.T.....T.....A.....G.A.....C.TG.G.....T.A	563
19	2280	480T.G.T.....A.A.....T.....C.....A.T.T.A.....A.T.A.G.....A.C.TG.C.A.A.A	561
20	V276	480T.....T.....T.....A.T.....T.....A.A.....C.....T.C.G.C.A.A.....	561
21	V274	480T.....T.....T.....A.T.....T.....A.A.....C.....T.C.G.C.A.A.....	561
22	LLK	480A.....T.....G.....G.C.T.A.....GT.T.C.A.....A.G.....C.TG.G.C.T.A	561
23	CF1/68	480G.....T.T.....T.....T.G.....A.T.....T.CC.C.T.A.T.....A.....G.C.C.G.AC	561
24	ML7	480	T.G.C.T.....C.A.....A.G.....A.T.AT.G.CC.A.A.A.T.....T.G.G.T.T	561
25	IJ-F-7	480	AA.....C.....C.T.G.G.A.T.C.....C.....A.G.....C.....CC.T.....AG	561
26	K1	480	AG.....C.....A.....G.G.A.T.....T.....A.T.....G.....A.....C.T.A.AG	561
27	28043-87	480T.....T.....T.C.T.G.G.AG.T.....T.C.....T.A.G.....T.G.G.....T	561
28	82857-91	480T.....T.....T.C.T.G.G.AG.T.....T.C.....T.A.G.....T.G.G.....T	561
29	89243-91	480T.....T.....T.C.T.G.G.AG.T.....T.C.....T.A.G.....T.G.G.....T	561
30	LS015	480A.....T.....T.C.A.G.....AG.T.....T.C.....G.A.....C.TG.C.....T.A	561
31	F65	480T.....C.....T.....G.AG.....T.C.A.....A.T.G.....G.....A.....A	561
32	182cvs5A	480	A.....C.T.....A.....G.....A.T.A.AA.C.....T.CA.G.T.T.....T.A	561
33	ML13	480T.....A.....A.C.T.G.G.A.T.CT.GA.....A.TC.....C.....G.G.....G	561
34	FCV-255	480	A.....T.....A.A.....A.G.....T.A.T.C.....C.....C.TG.A.....A.A	561
35	KS40	486T.....A.T.....T.G.C.A.....AT.TA.C.A.....T.....T.C.TG.....C.T.G	567
36	KS8	480T.....T.T.A.T.....T.ATG.A.T.....T.T.C.A.....AA.T.TA.G.....G.....C.C.G.A	561
37	K12	480	AC.....T.....AG.A.T.G.....A.T.C.T.....A.....G.T.....C.TG.G.T.T.A	561
38	A4	480T.....T.....A.....A.C.....T.T.T.....A.....G.....A.G.G.C.G.A	561
39	NADC	480T.....T.....C.....T.G.C.A.T.T.G.C.A.T.....T.T.....C.G.C.....AG	561
40	JOK63	480A.....A.....T.GC.....A.T.....T.C.....G.T.....C.TG.A.....G	561
41	K8	480T.G.A.....A.....T.G.G.....T.G.C.....T.A.....G.A.T.....A.AG	561
42	F4	480T.....G.G.A.T.CT.AA.....G.G.A.A.AG	561
43	IBARAKI 1	480T.....A.....A.....G.A.T.CT.A.C.A.....G.....A.C.G.GT.....A.AG	561
44	IJ-F-3	480G.T.....A.....T.C.....A.T.CT.A.....A.....G.....T.G.G.A.A	561
45	K5	480	A.T.G.T.....C.A.....T.C.....A.T.CT.G.....T.G.G.A.A	561
46	FS	480T.C.C.....A.....T.....A.T.AT.....A.....A.G.A.....C.TG.GT.....A.AG	561
47	FPL-NCI	480	A.G.....T.....A.....C.....A.T.T.T.....C.A.T.A.G.....T.G.A.T.A.A	561
48	KCD	480G.....C.T.....T.GC.....A.....GT.T.CC.T.....A.T.T.....G.T.....T.A	561
49	F9	489G.....T.....C.....T.GC.G.C.....GT.T.....C.....T.....C.C.C.T.A	570
50	K11	480	A.G.....T.....A.....G.G.....T.T.....A.CC.T.....A.....C.T.A.AG	561
51	K3	486	A.G.....T.....A.....A.C.G.C.T.....CC.T.....A.G.....T.G.C.C.T.AG	567
52	FCV-5	480T.....A.C.....C.....A.T.CT.G.....A.....G.....A.C.....A.A.AG	561
53	ML14	480T.A.T.....C.T.C.T.....C.A.T.CT.A.....A.....C.....T.....T.....A.A.AG	561
54	K4	480	A.G.....T.....A.....G.....T.....T.....C.....T.....C.A.T.C.C.T.G	561
55	ML1	480	A.G.C.A.....A.....T.G.G.T.....T.....T.....AA.T.TA.A.....ATG.C.T.T.G	561
56	K7	480	A.G.....A.....A.....T.....T.C.T.C.....T.A.T.....C.A.T.G.....C.C.T.G	561
57	IJ-F-9	480	A.G.A.A.....C.....G.G.T.....T.....T.....A.....G.T.....ATG.C.C.G.G	561
58	K10	480	A.G.....C.....T.G.G.TA.T.C.T.....A.T.....G.A.....C.A.G.C.C.G.G	561
59	IJ-F-4	480	A.G.T.C.T.....A.....A.....G.TA.....T.....G.....C.A.G.C.C.G.G	561
60	FCV-2	480	A.G.....T.....T.....TA.T.C.T.C.A.T.A.....A.G.C.T.G.AG	561
61	FCV-1	480	A.G.....T.....T.....TA.T.C.T.C.A.T.A.....A.G.C.T.G.AG	561
62	FCV-6	480	A.G.....T.....T.....TA.T.C.T.C.A.T.A.....A.G.C.T.G.AG	561
63	FCV-11	480	A.G.....T.....T.....TA.T.C.T.C.A.T.A.....A.G.C.T.G.AG	561
64	H17	480	A.G.....T.....A.....T.G.G.TA.T.....A.C.A.....AA.G.....C.A.....G	561
65	IJ-F-5	480	A.T.....A.....T.G.....T.....T.....C.....AA.....A.G.....C.A.AG	561
66	K9	480	G.G.....A.....A.A.....T.....G.TA.T.A.T.C.....AA.G.....T.C.A.....C.T.G.G	561
67	FCV-15	480	A.GT.A.A.....A.....A.....G.....TC.T.A.T.C.A.T.....T.A.....C.A.G.GT.....G	561
68	FCV-170	480	A.GT.A.A.....A.....G.....TC.T.A.T.C.A.T.....T.A.....C.A.G.GT.....G	561
69	H1	480	T.G.G.....G.TC.T.A.T.C.A.T.....T.T.....ATG.A.A.T.G	561
70	ML2	480	T.G.G.....G.TC.T.A.T.C.A.T.....T.T.....ATG.A.A.T.G	561
71	ML6	480	T.G.G.....G.TC.T.A.T.C.A.T.....T.T.....ATG.A.A.T.G	561
72	ML5	480	T.G.G.....G.TC.T.A.T.C.A.T.....T.T.....ATG.A.A.T.G	561
73	FCV-B	480	A.GT.A.A.....A.....T.....TC.T.AT.T.....AA.AA.T.....C.A.G.G.A.T	561
74	S1	480	A.GT.G.A.....T.....G.TC.T.A.T.....A.....T.....C.A.G.G.A.T.AG	561
75	S2	480	A.GT.G.A.....T.....G.TC.T.A.T.....A.....T.....C.A.G.G.A.T.AG	561
76	ND35	480	A.GT.G.A.....T.....G.TC.T.A.T.....A.....T.....C.A.G.G.A.T.AG	561
77	TOKYO 1	480	A.GT.G.AA.....T.....G.TC.T.A.T.....A.....T.....C.A.G.G.A.T.AG	561
		**.*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*.....	

Figure 2 continued

01	V77	562	CTGGTGCTCGTGGTGGAAATCATCCAATATTTTACAAAACTCCATCAAATTGGGTTATGTGATTAGTCTATT	635
02	V83	562C.....C.T.G.T.T.....A.C.....	635
03	ML19	565	...G...C...C.C.C.C.....T.G.....A.C...	638
04	Urbana	562G.....G...A.A.GC.T.G.....A.A...	635
05	LS012	562	...CGC...C.C.C.C...C.....A.GC.T.....AC.C.A...	635
06	K2	562	.A.....C.C.C.C.T.C.....G.T.A.T.C.C...A...	635
07	H10	562	...C...C...G.C.C.T.C.C...G.T.A.T...A.C...T.G.A.C...	635
08	ML12	562C...T...C.T.T.C...T.A.T...C.A.....	635
09	FRI-NCI	562	.C.....C.C.C.....G...T.....A.C.....	635
10	Bolin	562	.C.....C.C.C.....G...T.....A.C.....	635
11	KS20	565	...C.G.....C.C...T.C.T.GG...T...GC.T.C.C.CC.C.A.A.A	638
12	S103	562	...A.....C...C.T.C.C...G.T.T...A.....A...	635
13	S21	562	...A.....C...C.T.C.T.G.T...A.....A...	635
14	FCV-43	562	...G.....C.C...T.C.T.G...C.....A...	635
15	ML3	562	.C.G.....C...C.T.C.C.T...T.T.G.G...C...AA...	635
16	KS109	562	...C.C.C...C.C.T...T.T.T.C.T.G...T...	635
17	ML4	562	...A.....C.C.C.C.G...G...C.T...T.C.A...	635
18	258cvs484	564	.C.C.....G.C.....C...T.....C...C.A...	637
19	2280	562	...C...C.C.CT.C.C.C.C.T...TA.A.T...C.....	635
20	V276	562	...C...G...C...C.C.T...T.A.G...C.....A.C	635
21	V274	562	...C...G...C...C.C.T...T.A.G...C.....A.C	635
22	LLK	562	.C.G...A.....C...C.T.G...GC.C...C.C.A.A...	635
23	CFI/68	562	G...C.A...C...C.C.C.C...T...GC.T...A...C...	635
24	ML7	562	...G.C.C...C.C.C.C.T.C...C...C...A...	635
25	IJ-F-7	562	T...G.G...C.C...C.T.G.AAGC...GGC.T...C.A...	635
26	K1	562	...A.A...C...C...C...T.A...GCC...C.T.AA...	635
27	28043-87	562	...G.A...C.G...C.T.G.TAT...G.GC.C...A...A...	635
28	82857-91	562	...G.A...C.G...C.T.G.TAT...G.GC.C...A...A...	635
29	89243-91	562	...G.A...C.G...C.T.G.TAT...G.GC.C...A...A...	635
30	LS015	562	...A.G...G.C...C...G...T.A...A...A.A.A	635
31	F65	562	.C.A.A.C...C...C...T.A...T.C.A.C...	635
32	182cvs5A	562	...A...C...T...T.TT.G.A.A...A.G.A.A...	635
33	ML13	562	...C...C...T.C.C...C.C.T...T.A.T.GC.T.G...A.A...	635
34	FCV-255	562	...G...C...C.C...C.C...G...T.T.C.A...A...A	635
35	KS40	568	...A...G...C...C...G...TC.T.G.C.T.G...C...A.A	641
36	KS8	562	.A...A.C.A.T...T...C...TA.A.GC.T...G...A	635
37	K12	562	.G.G.C...C.G...GG.A.A.G...A.A...CACA.A...	635
38	A4	562	.C.A.G.C...C.C.C.C...T.G...A...GC.A.C...A.G...	635
39	NADC	562	T...G.C...C.C.C.G.C...T.T.T.GC.A.C...A...A	635
40	JOK63	562	...C...C...C.C.C...A.T.C.C...C...A...	635
41	K8	562	.C...C...A.C...C.C.C.C...G.T.A.A.G.A...C.A.C...	635
42	F4	562	...G.C...C...C.C.C...G...A.T...C...A...A...C	635
43	IBARAKI 1	562	...C.C.C...C.C.C.C...G...A.A...C.A.C...A...A.C.A	635
44	IJ-F-3	562	...C...C.C.C.C.C...G.T.A...A...C.A.C...	635
45	K5	562	.C...C...C...C.C.C.T.G.T.A...A.C.A.C...	635
46	FS	562	...G...C...C.T.C.T.G...A.T...G.C.A...A...	635
47	FPL-NCI	562	...G...C.C.C.C.T.G.TAGA...C.T.G...A...	635
48	KCD	562	...A...T.C.C.T.C.C...A.C...A.C.A.G...	635
49	F9	571	...A.C.T.C.C.C...T.C...G...T...A...A...A...	644
50	K11	562	.A...A...C.G.C.C.T.G...GT.G...A...A...A...	635
51	K3	568	...A.C.C...C.T.C...GG...T.G...C...C...C.A...	641
52	FCV-5	562	...AC.C...C.C.C.C...G...T.A.G...A...A...	635
53	ML14	562	TA...C...C.G.C.C...T.C.C...G...A.T...C...A.C...	635
54	K4	562	TCA.C.A...A...C.C.T...A.T.G.TA.T.A.G...C...A.AAA...	635
55	ML1	562	T.A.C...A.G...C.C...AC...T.TC.A...A...A.AAG.C...	635
56	K7	562	TCA.C.A...A...C...AC...A.C.A...A.A.AAA.A...	635
57	IJ-F-9	562	T.A.CT.A...G.T...C.T.C...A.T.G.C.T.A...A.AAA.C...	635
58	K10	562	T.A.CT.A.C.G.G.C...C.C.AC...A.T.G.C.T.A.C.CT.A.AA.C...	635
59	IJ-F-4	562	T.A.CT.G...G...C.T.C.AC...G.TA.C.G.C.C.C.T.A.AA.C...	635
60	FCV-2	562	T.A...A.C...G...C.T.AC...G.A.T.G.GG...C...G.AAG...	635
61	FCV-1	562	T.A...A.C...G...C.T.AC...G.A.T.G.GG...C...G.AAG...	635
62	FCV-6	562	T.A...A.C...G...C.T.AC...G.A.T.G.GG...C...G.AAG...	635
63	FCV-11	562	T.A...A.C...G...C.T.AC...G.A.T.G.GG...C...G.AAG...	635
64	H17	562	TCA.C.A...A...T.G.T...T.G.C.T.A.C.A.C.AA.C...	635
65	IJ-F-5	562	TCA...G.C...C...C.C...A...T.TC.A.G.A.A...AG...C...	635
66	K9	562	TGA.C...G...G...T...AC...T.G...C...A...A.C...A	635
67	FCV-15	562	TAA.C.A...C...C.C.T.C.AC...A.TT.A...A...A...GA...	635
68	FCV-170	562	TAA.C.A...C...C.C.T.T.AC...A.TT.A...A...A...GA...	635
69	H1	562	.A...A...G.C.C.T.C.AC...C.GTAAAC...A.C...A.C...GA...	635
70	ML2	562	.A...A...G.C.C.T.C.AC...C.TAAAC...A.C...A.C...GA...	635
71	ML6	562	.A...A...G.C.C.T.C.AC...C.TAAAC...A.C...A.C...GA...	635
72	ML5	562	.A...A...G.C.C.T.C.AC...C.TAAAC...A.C...A.C...GA...	635
73	FCV-B	562	.CA.CA.G...G...C.G.G.A...TTTG.TAAGC...A.A...A.AGAA...	635
74	S1	562	.CA.C.A.G.G...C...T.T.AC...G.AAGC.T.G...A.G...A.C.AAGAC...	635
75	S2	562	.CA.C.A.G.G...C...T.T.AC...G.AAGC.T.G...A...A.C.A.GAC...	635
76	ND35	562	.CA.C.A.G.G...C...T.C.AC...G.AAGC.T.G...A...A.C.AAGAC...	635
77	TOKYO 1	562	.CA.C.A.G.G...C...T.C.AC...G.AAGC.T.G...A...A.C.AAGAC...	635
			...*...**...**...**...*...*...*...*...*...*...**...**...	

Figure 2 continued

Isolate	(No. of amino acid)	(370)	(377)
KCD	1	ANRHFDFNQETAGWSTPRFRPITITISEQGGTKLIGVATDYIVPGIPDGPDTTISEELIPAGDYAITNDIGN-DIT-TPA	80
F9	1SV..T..N.A.....PG.....GT.....AT	80
KS40	1QNSA.I.....A.....R.V.....RV..D...AE	80
Urbana	1V...KN.A..V...F.....G.K.V.....GS.....AN	80
KS8	1V...KN.A..V...F.....P...N.....ST.A...R	80
82857-91	1V...QK..A...V.....A...P.D..V...KGN.T...S	80
28043-87	1V...QK..A...V.....A...P.D...KGN.T...S	80
89243-91	1V...QK..A...V.....P.D...KGN.T...S	80
F65	1Y...VS.Q.E.A...I.....RS.PSK.V...G...AKN..DIT.AA--	80
LS015	1L.....QKD.A...I.....PS..T...N...SGS...E..A	80
258cvs.484	1V...OR..A...I.....PD..V...SGNN...A..A	80
LLK	1V...QSD.A...I.....P...T...DST.G...A	80
S21	1V.KESA..T.I..F.....P.D..T...GK.G...AE	80
FPL-NCI	1V...VKESA..I.....A...P...T.E...RSGN..A..A	80
FCV-43	1V...VKESA..I.....P...T...SL...R..S	80
KS109	1M.V.M.VAKAA...I.....P.D.V...GK...AT	80
S103	1V...VKNSA...I.....GK...I-S.T	80
ML7	1N..K.....L...VKEAA...PKK.T...GENS...AK	80
ML3	1V.KDQA...C.....P.D.T...KN...AK	80
CFI/68	1V.KESA...I.....PG..V.V...GTN...A..A	80
ML4	1V.KD.A..T.I...P.V.T...SK...S	80
FS	1KN.S...G.S...A...T...TR...AE	80
ML12	1L..RN.E...L.S...PG...S..TRS...AS	80
K2	1S.....L..KD.S...PDT.T...TGD.T...AS	80
H10	1S.....SN.S...AG..T...S..SS...I..AH	80
K8	1SN.SR...C...ADV.T.S...S...GS...A..AK	80
F4	1KN.S...I...ADK...S..TGE...K..AQ	80
IBARAKI 1	1K.....SN.S...F...A.K.T...GS...I..A	80
NADC	1N.....A...SN.S...A.D.T...SGN...GS	80
A4	1SN.SR...T...TGN.C...AS	80
JOK63	1N.D...S...KN.S...P...T...S..NAN...A..A	80
FCV-5	1KN.SR...I...A...T...TGN...I..AN	80
ML14	1K.....K..S..T.I...A...V...S..TAN...E.K..A	80
FRI-NCI	1V...KE.S...I...A.K.T.T.N.S...TNS.TDIV.PSGY	82
FPL(Bolin)	1L.....V...KE.S...I...A.K.T.T.N.S...TNS.TDIV.PSAY	82
2280	1V...S..S..V...Q...P.K.T...N...TGNNSDIA.A.EY	82
IJ-F-3	1KE.S...C...A...S...GGND...V..A	80
K5	1KD.S...C...A...T...TGTN...I..A	80
LS012	1KKSS...L.S...P.D.V.V.N...TGS...AS	80
FCV 255	1T.KD.S...M.S...P.K.V...H...A.GT...GK	80
K11	1Y...V...VKD.A...T.I..F...G...T...S..SE...A	80
K3	1Y...V.M.VKD.S...EGK...TA...A	80
IJ-F-7	1I...VN.VKD.A...T...PGK.T...SSD...V..A	80
K1	1Y...SV...VK.A...V...PG...V...S..THN.T...AS	80
182cvs.5A	1L...OKE.A..T...FGDQT...KDSOIT.RSE-	81
K12	1VN..OKD.A..V...L.S...P...T.T.L...D.V..D..KTKA-	80
KS20	1W...VN..QNK.A...I...S...P.V.T...N.S...TGS..D..V..AK	80
ML13	1R...V.L.VKD.K...H...G...V...SDSS...V..NA	80
v276	1V...OKE.A.I..C.P.H...K...NR...A	80
v274	1V...OKE.A.I..C.H...P.K...NG...A	80
ML19	1V...QDR.A...I...S...PGK.V...TGN...AE	80
v83	1L...OKN.E...S...K.T...TSN...AK	80
v77	1V...QDK.A..V...P...T...K...TS...I..A	80
ML1	1K...M.N..QKE.A.I...ES...P.K.T...VDQKS.DI..KA--	80
K4	1K...M.N..OKDRAM.I...S...PN..V...VDGK..DIT.LA--	80
IJ-F-4	1M.VN..QHN.E.I...V.S...PVK.T.T...DQTN.DIT.AA--	80
K10	1K...M.N..QDKSA.I...V.S...PTK.T...DQLN.DIT.SQ--	80
IJ-F-9	1K...M.N..QER.A.I...I.IES...P.T...DOTNSDIT.LE--	80
K7	1K...M.V...QKD.A...I...S...PH..T.V...IDQNHTDIT.RD--	80
FCV-2	1K...VS..Q.K.A...I..S...P.G...IDHTTSDIT.SK--	80
FCV-6	1K...VS..Q.K.A...I..S...P.G...IDHTTSDIT.SK--	80
FCV-1	1K...VS..Q.K.A...I..S...P.G...IDHTTSDIT.SK--	80
FCV-11	1K...VS..Q.K.A...I..S...P...IDHTTSDIT.SK--	80
IJ-F-5	1K...L.V..QK.A...I..S...PG..T...VDQG..DIV.AA--	80
ND35	1K...MR..QS..A..N..LES...P...V...QSN.DIS.LA--	80
TOKYO 1	1K...MR..QS..A..N..LES...P...V...QSN.DIS.LA--	80
S2	1K...MR..QS..A..N..LES...P...V.V...QSN.DIS.LA--	80
S1	1K...MR..QS..A..N..LES...P...V...QNN.DIS.LA--	80
H1	1K...MRV..QS..ATS.N..IES...PGK.V...V.ESA.DIK.AE--	80
ML2	1K...MRV..QS..ATS.N..IES...PGK.V...V.ESA.DIK.AE--	80
ML6	1K...MRV..QS..AT.N..IES...PGK.V...V.ESA.DIK.AE--	80
ML5	1K...MRV..QS..AT.N..IES...PGK.V...V.ESA.DIK.AE--	80
FCV-15	1K...MRV..QS..A...L.A...PS..T...I.QNSADIR.AQ--	80
FCV-170	1K...MRV..QS..A...L.A...PS..T...I.QNSADIR.AQ--	80
FCV-B	1K...MRV..QK..AM...S...P.K.T...S.V.QTK.DIT.AA--	80
H17	1K...S...QR..A..TA...S...PD..T...DQTN.DI..RA--	80
K9	1K...L.V...QKN..M...A...PAK.T.T...DGT..DITSAA--	80

Figure 3 Comparative amino acid sequence (370-580) analysis generated from the translation by nucleotide sequence of capsid protein of FCVs in Figure 1. ★=Identical amino acid

KCD	81	GYDAADT--IKNNTNFRGMVYCGSLQRAWGDKKISNTAFITATVKNN---KLK-PSNMI-DQTKIAVFQDNHVGDKVQTS	155
F9	81	...T.I--.....I.....LDGNNN--IN.C.T.DQSKIVV-.....K.A....	158
KS40	81K--...A..K..I.....I.N.DEKNNTLTPS--V.DQSKIAVFQDN--NLD.....	157
Urbana	81	Q...I--R...K..I.....EG---D-I--...V.DQTKIAI-.....Q.E....	155
KS8	81	E.ES.E--.....K..I.....D.....I...V..H.....VD.....	155
82857-91	81	D..S.V--...D...KS..I..P.....P.....A.G--T--...T.DPTKIAVFQDN--NAE.....	155
28043-87	81	D..S.V--...D...KS..I..A.E.....PG.DT--T--...T.DPPKIAVFQDN--NAE.....	155
89243-91	81	D..S.V--...D...KS..I..AF.....A.D--T--...T.DPTKIAVFQDN--NAE.....	155
F65	81	Q...GE-IVN-...KS..I..A.....V.....V.....TG.TLK--PSNT--DNTKIAIYQDNH--NSD.....	155
LS015	81	E..S.V--R...S..I..A.....S.SG---E...T...S.....K...NRD.....	155
258cvs.484	81	D...V--...S..I.....G.....ED---I...T...S.....ETN.....	155
LLK	81	K..IT.K--VT...KS..I..C.....SG--N--...V.DQTKIAIYQDN--NKE.....	155
S21	81	...S.I--...K..HI.....GI.NGKLI--P-S--V.DQTKIAVFQD-T.ANHDP.....	155
FPL-NCI	81	FGS..I--...K..I.....GII.DDKLT--P-S--V.DOPKIAVFQD-T.TNYDI.....	155
FCV-43	81	E..S...--Q.D...I.....GI.GG--M-V-QPSNVI.....T.A.YD.....	155
KS109	81	...T.I--R...I.....GI.EG---...V-I..S...I...T.ANEE.....	155
S103	81	E..T.TI--R...E...I.....GVI...--T.S...V-I.....T.ANEE.....	155
ML7	81	D..N.GV--...I.....G..G--D.L...V-I.....T.ANSE.....	155
ML3	81	S..E.EV--...I.....G..EGG--I--PSEVI.....T.A.KD.....	155
CFI/68	81	Q...TE--R...I.....G..DGA---I...T-I.....T.ANKH.....	155
ML4	81	QF.S.E--...I.....G..EG--NIQ...V.D-P.....T.EKET.....	155
FS	81	A..S.V--...I...R.....VRIT---...V.DMP--L...T.AKET.....	155
ML12	81	Q..T.E--N.T...I.....VKTG---T...V.DMT--L..Y..T.NRE.....	155
K2	81	...AV--...I.....RDK---SIS...T.DMTKLA-V..Y..T.NS.....	155
H10	81	E..S.E--...T...I..A.....A.....IKEG---I...T.DMT...Y..T..D.....	155
K8	81	D...V--...T...I.....IKE---I...I.DMT--L..Y..T..D.....	155
F4	81	A..T.AV--V..T...I.....IRDG---EI...T.DMTKLA-V..Y..T.EQE.....	155
IBARAKI 1	81	EF.K.NV--...I.....K.D---SIE...T.DMT--L..Y..T..KD.....	155
NADC	81	E..STEV--...I.....IKEG---IR...T.DMTKIAV-Y..T..EE.....	155
A4	81	V..S.NV--...I.....IK.G---NI...T.DMTKLA-V..Y..T..HD.....	155
JK63	81	D..STGV--...T...T.....S.....IRE---II-C.T.DMT...Y..T..SD.....	155
FCV-5	81	QF.T.NE--D...I.....D.....VK.D---T...T.DMT...T..RKE.....	155
ML14	81	Q..T.SV--...D...I.....R.....IRDG---T...T.DIS...T..AD.....	155
FRI-NCI	83	DTA--DVIRNTE--...I..A.....A.....VVKDG.NITPS--NV--DQTKIVVYQDTHVKEH-	155
FPL(Bolin)	83	DTA--DVIRNTE--...I..A.....A.....VVKGG.NITPS--NV--DQPKIVVYQDTHVKEH-	155
2280	83	DHA--DEIKN.TN--KS..I.....VKEG.SITPS--NT--DMTKLVYQDAHVGN-	155
IJ-F-3	81	A..S.V--...I.....RDG---I...T.DITKIVV-Y..T..RE.....	155
K5	81	A..S.V--...I.....IRERD---I...T.DITKLA-V..Y..T..KEA.....	155
LS012	81	E..S.V--VR...I..A.....O.S.....IRDGA---I...T.DATKIAV-Y..T..KD.....	155
FCV 255	81	D..S.TV--Q...K..I.....P.RSD---TIT...V.DPTKIAV-Y..T..A.....	155
K11	81	...V--...T...I.....G..ED--KII--PS-T.DQTKIAISQ-T.ANRD.....	155
K3	81	...V--...I.....G.ISE.DNSIT-PN-T.DHTKIAIFQ-T.KQE.....	157
IJ-F-7	81	S...V--Q...I..A.....DG--N-D-I-C.T.DQTKIAMFHDT-A.SE.....	155
K1	81	...T.I--...K..I..A.....EG--N--V-C.T.DQTKIAMFHDT-APATI.....	155
182cvs.5A	82	-E..SE-IKN.T--KS..I.....GL.GSINGSKIIPS--N--DQTKIAIFQDN--RE...N	155
K12	81	E..S.AI--S...S..I.....N.....DE.SLF--PSNT--DQTKIAIFQDN--NE.....	156
KS20	81	D..G.V--...T...I.....I.GENQ-LEPS--T.DQTKIAIFQDN--NE.....	155
ML13	81	S...ST--N.T...I.....NG---IE--T.DQTKIAI--T..KTE.....	155
v276	81	A...V--...I.....IL.D---Q-IE.N.I.DPTKLVV--...KEN.....	155
v274	81	A...V--...I.....IL.D---Q-IE.N.I.DPTKLVV--...KKN.....	155
ML19	81	Q..G.V--...I.....DL.DT--NTIT...V.GPTKIVI--...NNE.....	156
v83	81	A..T.V--...I.....SGT---S.N...T..P.....NLD.....	155
v77	81	A...V--...D...I.....A.....IF...T...N.....KD.....	155
ML1	81	A.E..TS-ITN-...KS..I..A.....V.....GEL.G.SIS--PSNV--DQNKI.VYQDNH--MQ.....	155
K4	81	E...TM-IKND-...KS..I..A.....V.....L.G.KII--PSNV--DPSKIVVFQDNH--QD.....	155
IJ-F-4	81	F.N.TE-IKN-...I..A.....V.....DLNG.EIT--PSNV--NQSRIVVQDNH--NKD...N	155
K10	81	Q..S.TE-I.N-...I..A.....V.....V.....NLDE.KIT--PSNV--NQSRIVVQDNH--N.Q...N	155
IJ-F-9	81	Q..S.TE-IRN-...KS..I..A.....V.....V.....LNG.RIL--PCNV--DQNKIVVYQDNH--K.Q...N	155
K7	81	Q...TE-I.N-...KS..I..A.....V.....V.....LD..KIF--PSNV--DQNKI.VFQDNH--AI.....	155
FCV-2	81	Q..S.IK-ITN-...S..I..A.....V.....LD..KIF--PSNV--DQNKI.VFQDNH--AI.....	155
FCV-6	81	Q..S.IK-ITN-...S..I..A.....V.....LD..KIF--PSNV--DQNKI.VFQDNH--AI.....	155
FCV-1	81	Q..S.IK-ITN-...S..I..A.....V.....LD..KIF--PSNV--DQNKI.VFQDNH--AI.....	155
FCV-11	81	Q..S.IK-ITN-...S..I..A.....V.....LSG.KII--PSNT--GQDKIVVFQDNH--NSE.....	155
IJ-F-5	81	S...TK-ITN-...KS..I..A.....V.....V.IGVIEGSKIK--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
ND35	81	A...TE-IRN-...KS..I..A.....V.....V.GVIEGSKIK--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
TOKYO 1	81	A...TE-IRN-...KS..I..A.....V.....V.GVIEGSKIK--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
S2	81	A...TE-IRN-...KS..I..A.....V.....V.GVIEGSKIK--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
S1	81	A...TE-IRN-...KS..I..A.....V.....V.GVIEGSKIK--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
H1	81	QF.S.T-IVN-...KS..I..A.....V.....GIIT..AIT--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE...LM	155
ML2	81	QF.S.T-IVN-...KS..I..A.....V.....GIIT..AIT--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
ML6	81	QF.S.T-IVN-...KS..I..A.....V.....GIIT..TIT--PSNT--DQTKIVVFQDNH--NSE.....	155
ML5	81	QF.S.T-IVN-...KS..I..A.....V.....G..S..KIS--PSNT--DQTKIVVFQDNH--KAD.....	155
FCV-15	81	E...TS-I.N-...KS..I..A.....V.....G..S..KIS--PSNT--DQTKIVVFQDNH--KAD.....	155
FCV-170	81	E...TS-I.N-...KS..I..A.....V.....G..LDG.SIL--PSNT--DPTKI.VFQDNH--KAE.....	155
FCV-B	81	Q..S.TE-ITN-...KS..I..A.....L...SLDG.KIF--PSNI--DQTKV..VFQDNH--KEE.....	155
H17	81	K...TE-IRN-...S..I..A.....V.....G.LDKTSII--PSNT--DQHKI.VFQDNH--KAD.....	155
K9	81	...G.V-ICN-...I..A.....V.....G.LDKTSII--PSNT--DQHKI.VFQDNH--KAD.....	155

Figure 3 continued

	(539)	(557)	(556)	(580)	
KCD	156	DTLALLGYTGIGEQAIGSDRDKVVRISVLPETGARGGNHPIFYKNSIKLGYVIRSI			211
F9	159R.....T.....			214
KS40	158EP...N...R.....A.....LR.....			213
Urbana	156E...AN...ER.....T.....			211
KS8	156M.....GT.....L.....G..			211
82857-91	156	V.....E.V.A.....IM.....			211
28043-87	156	V.....E.V.A.....IM.....			211
89243-91	156	V.....E.V.A.....IM.....			211
F65	156	V..S.....E.V.A...L.....			211
LS015	156	V.....E.V.A.E.....			211
258cvs.484	156	V.....E..A.....			211
LLK	156A...H.....L.....			211
S21	156E..A...R.....A.....			211
FPL-NCI	156M.....R.....R.....			211
FCV-43	156GP.....R.....A.....T.....			211
KS109	156E...N.....A.....			211
S103	156E..A.....			211
ML7	156E...ER.....			211
ML3	156	..S.....E..A.NR.....A.....M...L.T.			211
CFI/68	156E..A...R.....R.....H.....			211
ML4	156L.....			211
FS	156E.....R.....A.....			211
ML12	156	..S.....H.....R.....			211
K2	156GE.....R.....			211
H10	156E...N...R.....A.....L.....			211
K8	156E.....R.....A.....			211
F4	156E...N...R.....A.....			211
IBARAKI 1	156E.....R.....A.....			211
NADC	156	..A.....E.....R.....V.....			211
A4	156R.....N.....			211
JOK63	156R.....			211
FCV-5	156R.....I..A.P.....			211
ML14	156R.....I..V.....			211
FRI-NCI	156AP.....R.....T.....			211
FPL(Bolin)	156A.....R.....T.....			211
2280	156	V.....R.....Y...T.....			211
IJ-F-3	156R.....			211
K5	156I.....R.....			211
LS012	156I.....R.....R.....L.....			211
FCV 255	156I.....E..A...R.....			211
K11	156M.....G..AN..R.....I..A.....M...CM.....			211
K3	158M.....A...R.....A.....R..M.....			213
IJ-F-7	156	V...Q.....E..A...R.....T..V.....KLR.....			211
K1	156	V...Q.....E..A...R.....T..A.....A..K...			211
182cvs.5A	156	I.F.I.....E..AN..T.....I.....FM.I...G..			211
K12	156	V...T...V.E..A.....R.TM...HT.....			211
KS20	157H..EP..N.....A.....R.....L.....			212
ML13	156E...N...R.....			211
v276	156E..A..ER.....			211
v274	156E..A..ER.....			211
ML19	157	..P.....E.V.A...R.....M.....			212
v83	156E..A...R.....			211
v77	156E..A...R.....I.....			211
ML1	156	V...M.....EV..A.....N...VS.....Y...L...KA.....			211
K4	156	V...M.....EV..A...R...NT...VS.....Y...TLR...KT.....			211
IJ-F-4	156	V...MF.....EV..A...R...N...VSS.....Y.R.TL...L.T.....			211
K10	156	V...M.....EV..A...R...N...VSS.....Y...TL...L.T.....			211
IJ-F-9	156	V...M.....EV..A...R...N...VSS.....Y...TL...KT.....			211
K7	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TL...KT.....			211
FCV-2	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TLR...V...V.....			211
FCV-6	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TLR...V...V.....			211
FCV-1	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TLR...V...V.....			211
FCV-11	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TLR...V...V.....			211
IJ-F-5	156	V...I.....EV..A...R...N...VS.....Y...L...V.....			211
ND35	156	V...M.....EV..A...R...N...AS.....Y...KL...KD.....			211
TOKYO 1	156	V...M..N..X.EF..A...R...N...AS.....Y...KL...KD.....			211
S2	156	V...M.....EV..A...R...N...AS.....Y...KL...KD.....			211
S1	156	V...M.....EV..A...R...N...AS.....Y...KL...C...KD.....			211
H1	156	V.....EV..A...R...N...AS.....Y.Q.KL...D.....			211
ML2	156	L.....EV..A...R...N...AS.....Y.Q.KL...D.....			211
ML6	156	V.....EV..A...R...N...AS.....Y.Q.KL...D.....			211
ML5	156	V.....EV..A...R...N...AS.....Y.Q.KL...D.....			211
FCV-15	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TL...D.....			211
FCV-170	156	V...M.....EV..A...R...N...VS.....Y...TL...D.....			211
FCV-B	156	V...M.....EV..A...N...N...ST...VY.L.KL...E.....			211
H17	156	V...M.....EV..A...NI...VS.....Y...L...K.....			211
K9	156	V...GV.....EV..A...NI...VS.....Y...L.....			211
	*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*			

Figure 3 continued

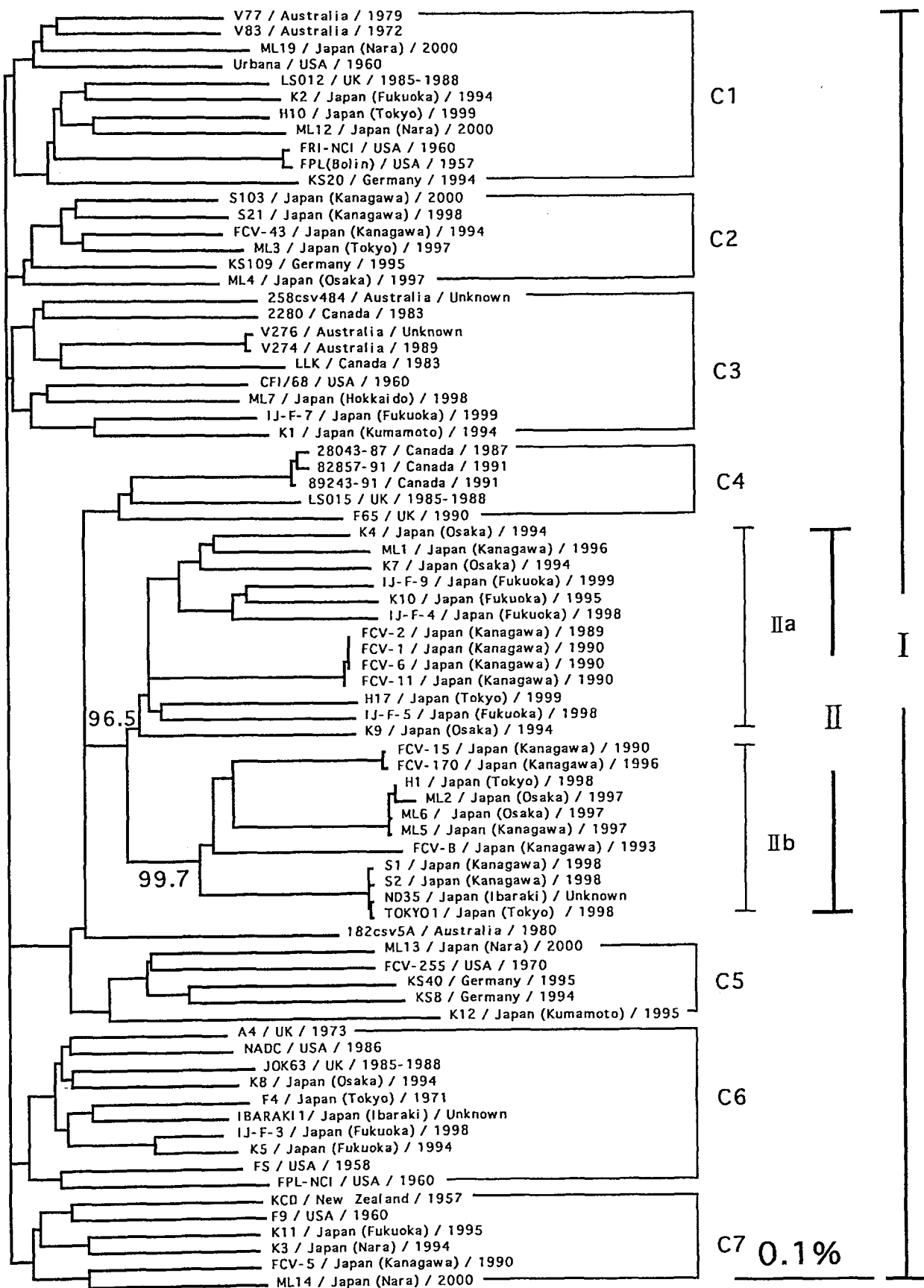


Figure 4 Unrooted phylogenetic tree of FCVs using nucleotide sequences. The tree was produced using the NJ method. The two major genogroups were designated as groups I (clusters C1~C7) and as II (subgenogroups IIa and IIb). Bootstrap values (%) are indicated at the relevant nodes. Evolutionary distances are to scale.

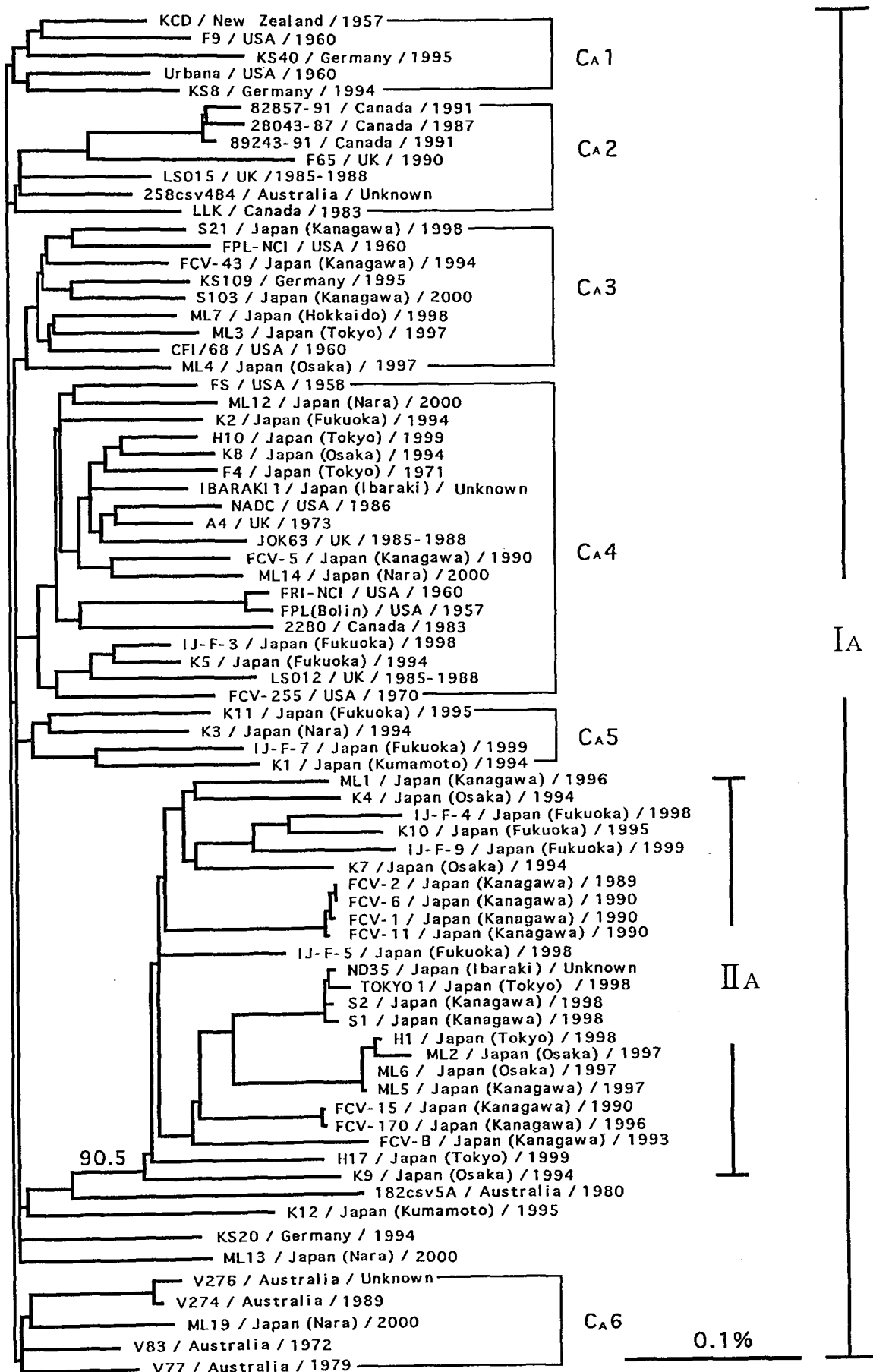


Figure 5 Unrooted phylogenetic tree of FCVs using deduced amino acid sequences. The tree was produced using the NJ method. The two major genogroups were designated as groups IA (clusters CA1~CA6) and as IIA. Bootstrap values (%) are indicated at the relevant nodes. Evolutionary distances are to scale.

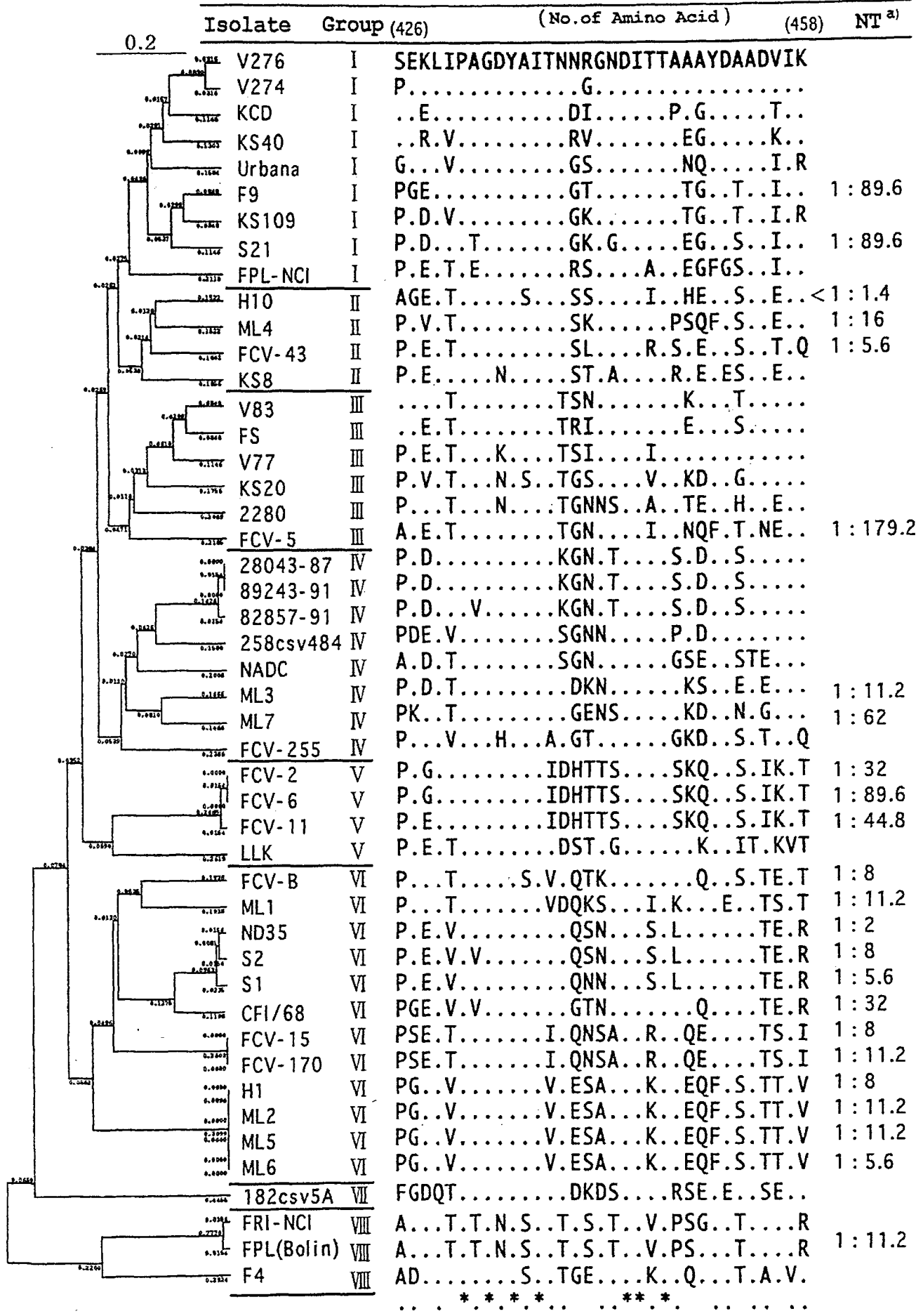


Figure 7 Phylogenetic tree (UPGMA) illustrating relatedness among feline calicivirus isolates and their virus neutralization titers to F9 antiserum. Multiple alignment of capsid protein amino acid sequences from 426 to 458. Reciprocal virus neutralization titers were generated by making two-fold dilutions of sera from a cat inoculated with F9 virus. a) Virus neutralization test, reciprocal titer.

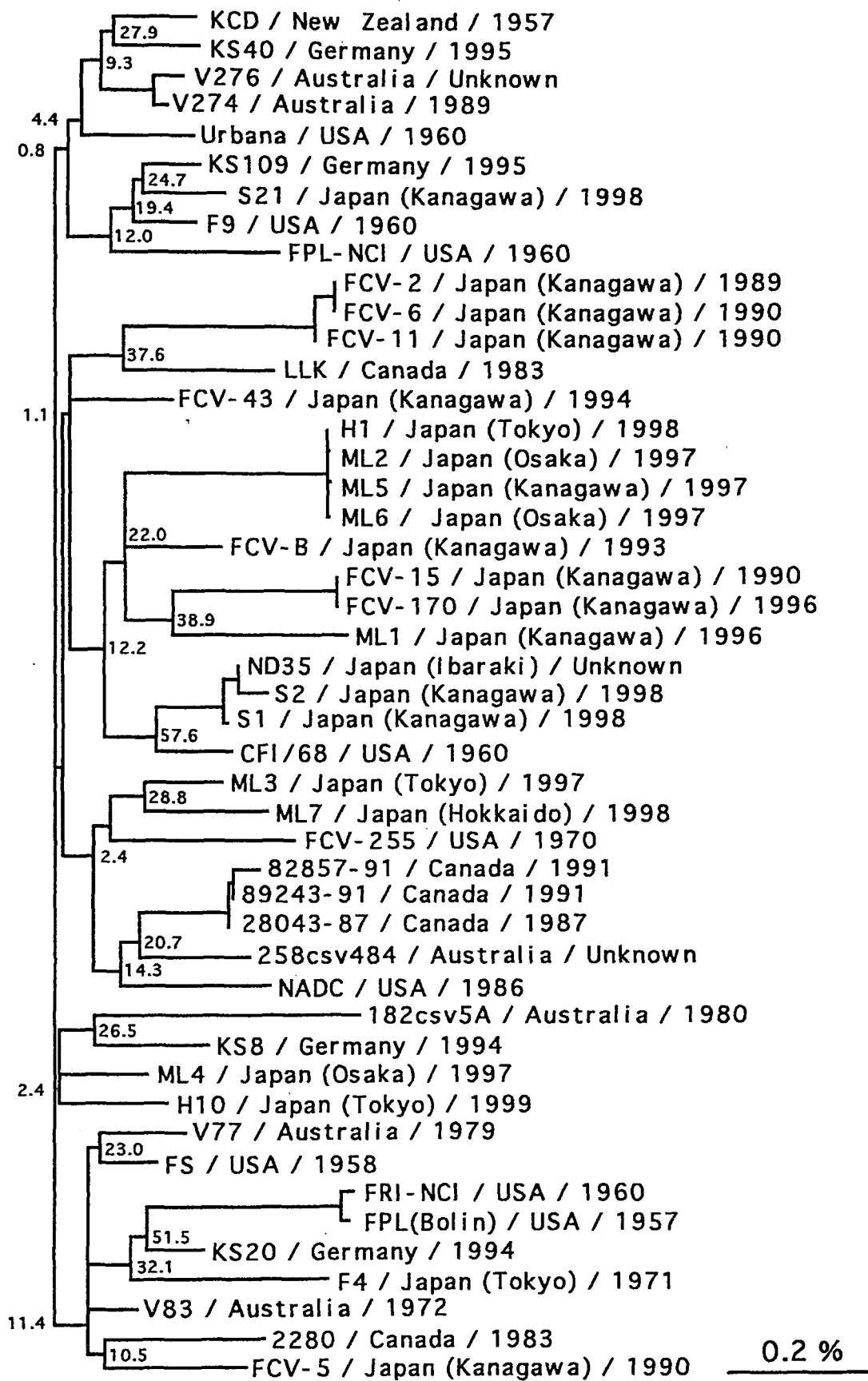
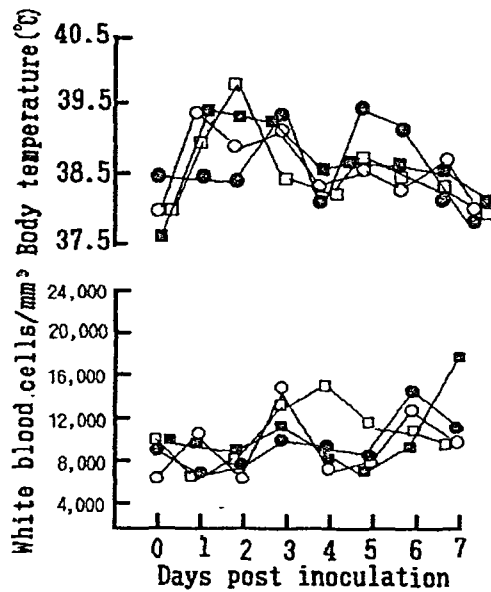


Figure 8 Unrooted phylogenetic tree using capsid protein amino acid sequences from 426 to 458 among FCVs in Fig.7. The tree was produced using the NJ method. Bootstrap values (%) are indicated at the relevant nodes. Evolutionary distances are to scale.



Cat No.	Watery Diarrhea						
1	-	+	+	+	+	+	-
		1.25	1.25	-	-	-	-
2	-	+	+	+	+	+	-
		-	-	-	-	>1.5 ^{a)}	-
3	-	-	+	+	+	+	-
		-	-	-	>2.5	>2.5	-
4	-	+	+	+	+	+	-
		0.25	-	-	>2.5	-	-

a): Log. TCID₅₀/0.1ml

Figure 9 Experimental infection of FCV-S in vaccinated cats (Nos. 1 (□), 2 (■), 3 (○) and 4 (●)) by peroral inoculation. Clinical signs: Rectal temperature, White blood cells and watery diarrhea. a) Viral titers (1 log TCID₅₀ /0.1ml). +, diarrhea. -, negative.

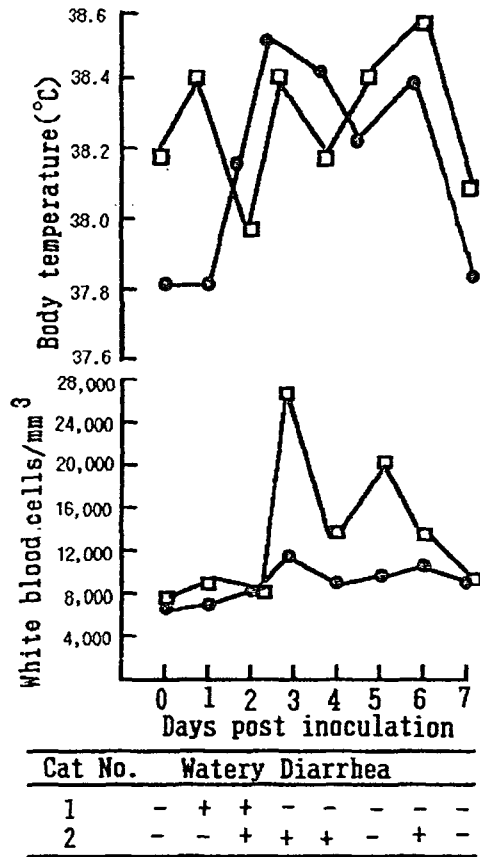


Figure 10 Experimental infection of isolate (FCV-S) in non-vaccinated cats (Nos. 1 (●) and 2 (□)) by peroral inoculation. Clinical signs: Rectal temperature, White blood cells and watery diarrhea. +, diarrhea. -, negative.