

氏名(本籍)	佐藤良治(福岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第398号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 原 元 宣 (副査) 木 内 明 男 藤 谷 英 男 田 淵 清 (本学名誉教授)

## 論文内容の要旨

ネコカリシウイルス *feline calicivirus* (FCV) はネコの呼吸器病の原因ウイルスとして重要であり、プラス一本鎖 RNA を持ち、粒子の直径は 27~40nm とピコルナウイルスよりやや大きく表面に窪みのある形態学的特徴を有するウイルスである。最近、ネコにおいて致死性の兎ウイルス性出血病様症例が Pedersen ら (2000) により報告され注目を集めている。本疾患の予防にはワクチンが投与されているが、十分に防圧するに至っていない。この理由として FCV の変異の激しさが指摘されている。FCV の血清型については中和試験、モノクローナル抗体により検討されてきたが血清多型性は認められないことから、各株は同じ血清型の variant とみなされていることがあげられる。一方、遺伝子の系統解析も試みられているが未だに遺伝子型別がなされていないことから、Glenn ら (1999) は FCV が単一の遺伝子型からなるため血清学、病原性の生物学、地理および年代などと遺伝的関連性がないのではないかと考えた。

本論文は FCV の遺伝子型を検討し分子疫学的研究を行なったものであり、FCV の遺伝子型別を初めて明らかにし、流行の把握と新たなワクチン開発の必要性に関する成績を得た。

FCV の塩基配列に基づく系統樹を用いて遺伝子型別を行うため、日本株 47 株と外国株 30 株の合計 77 株についてカプシド領域 (B-F) の 1105 から 1739 番目の塩基配列およびアミノ酸配列 (307-580) を決定した。そしてこれによって作成した系統樹と年代、地域性、病原性、血清学的性状の関連について検討を行った。また、ワクチンブレイクを呈したネコから分離した一部の株について遺伝子型別とワクチン抵抗性について検討を試みた。

### 1. 遺伝子型の検討

1-1 遺伝子群の解析 系統樹の解析により FCV は高い確率で 2 遺伝子に分かれることが明らかになった。用いた 77 株のうち 53 株 (69%) が遺伝子群 I (genogroup I) に、24 株 (31%) が遺伝子群 II

(genogroup II) に属することが明らかとなった。これらのブートストラップ値は96.5%と十分高かった。群IIはさらに99.7%のブートストラップ値で2遺伝子亜群 (subgenogroup ; II a、II b) を形成した。亜群II aには日本株13株 (17%)、亜群II bには11株 (14%) が含まれた。

**1-2 アミノ酸の系統樹解析** 遺伝子の塩基配列により想定されるアミノ酸配列に基づく系統樹では遺伝子群I、IIに相当するIAとIIAの2群に大別されたが、IIAの亜群に関しては遺伝子亜群II a、II bと異なりブートストラップ値が53.6%と低く、アミノ酸配列の亜群として区別されなかった。このことから疫学的検討には塩基配列による系統樹を用いた。

**1-3 アミノ酸の比較** アミノ酸の多重解析により群Iと群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、群Iのアラニンまたはプロリンが、群IIではバリンまたはフェニルアラニン、又、557番目のグルタミン (群I) がセリン (群II) と、2箇所アミノ酸残基の置換があり、この置換を指標として型別を行える可能性が示唆された。

## 2. 疫学的検討

**2-1 国別の分布比較** 分離された国別にFCVを遺伝子型別に分けると、群Iにはドイツ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株と、外国で分離された株はすべて群Iに属し、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。日本株のうち約半数の23/47 (49%) が群Iに属し、群IIは24/47 (51%) の日本株のみからなっていた。このことから群IのFCVは日本を含め広く世界中に分布しており、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** 群Iに属する日本株の分布は九州64%、近畿58%、関東33%で、地域間における有意な差は見られなかった。また、各都道府県における群I、II a、II b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** 日本株については分離された年代別に、I、II群の分布を比較したところ、特に遺伝子群と年代の関連は確認されなかった。

**2-4 塩基配列の相同性** 日本株20株と外国株の塩基配列について相同性を比較したところ、群Iあるいは群IIの中ではどちらの群でも約70%程度の群内相同性が認められ、群Iと群IIの間では大体60-70%の相同性がみられた。同様に、アミノ酸配列については群Iあるいは群IIの中では約80%程度の相同性が認められたのに対し、群Iと群IIの間では70%程度であった。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。また、ワクチン株F9およびFCV255はいずれも群Iに属し、群IIの日本株との相同性は約70%程度と低く、今回用いた日本株は群IIの日本株と遺伝的に隔たりがあることを示していた。

**2-5 近縁性** 系統樹で群Iに属する7つのクラスター (C1~C7) に分けられた株間の相関性から近縁性を検討したところ、アメリカ、カナダ、オーストラリアにおいて分離された群Iの株間では近縁性が高く、近縁株が分離年代や地域の隔たりを超えて流行していたことを示していたが、群Iの日本株間には高い相同性を持つ株は認められなかった。しかし、群IIのウイルスにおいて、近縁な複数の

株が狭い地域内で流行していることもあり、又、異なる地域にまたがって流行していることもあ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をもつネコ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。上述のように分けられたクラスターと比較すると、下痢を起こす株は群ⅠのC2とⅡb亜群に属し、慢性胃炎を起こした株はC1とC4に、急性胃炎、健康な個体に由来する株もそれぞれ異なったクラスターに属し、跛行を起こした株は同じC3に属していたが離れた位置にあり、塩基配列に基づく系統的差異と病原性とは明らかな相関関係はなかった。

ウサギウイルス性出血病ウイルスと似た病原性を有するFCV-Ari株のE領域の塩基配列について、突然死したネコから分離したFCV-S株および実験感染により死亡を認めたH10株の塩基配列と比較したところ、相同性はそれぞれ70.4%、74.7%と、比較的低かった。

**2-7 血清学的性状** 日本株21株の抗F9株免疫ネコ血清に対する中和抗体価と遺伝子型との関連について検討したところ、群Ⅰの7株の抗体価の幾何学平均値は $20.5 \pm 5.5$  (平均 $\pm$ SD)、群Ⅱの14株の幾何平均値は $11.3 \pm 2.6$  (平均 $\pm$ SD)で、2群間の抗体価には顕著な差はなく、従来の報告にあるように、中和抗体と遺伝子型との相関性は認められなかった。

**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株免疫ネコ血清の中和抗体に対する反応性が、カプシド遺伝子の超可変領域(E領域、アミノ酸配列426-458:抗原性と関連がある)のアミノ酸配列の変異と相関するかどうかを、Sealにより報告されたUPGMA法で作成された系統樹によって検討した。FCVはⅠ-Ⅷのクラスターに分別され、クラスターの構成メンバーの反応性を比較したところ、抗体の反応性と変異の型(近縁度)は必ずしも相関しないことが判明した。

**2-9 NJ法による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ろ、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て、明瞭な遺伝子型に分かれなかった。このことからE領域は地域性とも関連しないようである。

### 3. ワクチンに対する抵抗性の検討

ワクチン(F9株)接種済みのネコから分離されたH10株とFCV-S株の2株について遺伝子型を決め、ワクチン抵抗性の株別の変異を検討した。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呈した。この株を市販ワクチン(F9株)で免役したネコ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、市販ワクチンF9株免疫ネコ血清に対してH10株の抗原性は低かった。そこでH10株に対する抗体価を上げるため市販ワクチンを3回投与した4頭とワクチン未接種のネコ3頭にH10株の経鼻・経口投与を行なった。この結果、ワクチンの投与により抗体価が上昇した場合にはウイルスの排泄は短期間で終わるが、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ウイルスを排泄することからワクチン抵抗株を産生する可能性がある。

**3-2 FCV-S株に対する感染防御** 1回のワクチン投与を行なった4頭のネコ、市販ワクチンを投与し

ていないネコ2頭に対してFCV-Sで攻撃した。市販ワクチン未接種、接種のどちらの個体も同じ様に、体温の上昇、白血球数の増加、下痢が見られ、糞便におけるウイルスの排泄は6日間以内に限定された。FCV-Sについてはワクチンによる顕著な防御効果は見られなかったことから本ウイルスは市販ワクチンに抵抗性を示すものと思われる。本ウイルスの投与による呼吸器症状は見られず、下痢を呈した点については、下痢発症ネコ由来のFCVは酸性（pH3）に抵抗性を示すことが報告されているが、FCV-SもpH3に抵抗性を示したことから本ウイルス株と理化学的性状に共通性があるようである。今後FCVのワクチンの開発には現在使用されている群Iに属するワクチン株（F9株、FCV255株）に加え、群IIのFCV株をワクチン株として併用する必要があると考えられる。

本研究によりFCVは2種類の遺伝子型からなることが明らかになった。群Iは広く世界に流行しているが、群IIのウイルスは日本においてのみ見られ、今後このウイルスの起源を探る手がかりを与えると考えられる。また、特に日本においては群IIのウイルスに対する抗体による治療、またはワクチンを開発することがFCV感染症の効果的防御に重要であると結論できる。

## 論文審査の結果の要旨

ネコカリシウイルス *feline calicivirus* (FCV) はネコの呼吸器病を起こすピコルナウイルスとして発見されたが、粒子表面の特有な陥没を示す形態学特徴や増殖様式の違いから新にカリシウイルス科に分類された。最近ではPedersenら（2000）により致死性のウイルス性出血病様症例が報告され注目を集めている。本ウイルスは変異が激しいことから、今日に至ってもワクチンによる十分な防圧ができず、今後さらにこのような病原性の強いウイルスが出現する可能性を残している。

本感染症の防圧にはFCVの流行に関する詳細な疫学的検討が重要である。しかし、本ウイルスに関しては未だに血清型や遺伝子型別が認められないことから、疫学的研究に支障を来している。Glennら（1999）によれば、FCVは一つの遺伝子型からなっているので、本ウイルスの流行は血清学的性状、病原性、地理および年代などに遺伝学的特徴が見られないのではないかと指摘している。

本論文はこのような背景をふまえ、FCVの遺伝子型に関する研究を試み、FCVの遺伝子型の存在を初めて明らかにした。さらに分子疫学的検討を行ない、流行状況と今後の新たなワクチン開発に関する展開に重要な示唆を与えている。

遺伝子配列はFCVのカプシド領域（B-F、1105から1739番目）をSealの方法によってPCRで増幅し、TAクローニングベクターに挿入して決定した。この塩基配列およびアミノ酸配列（370-580）の系統樹解析により遺伝子型別を行い、疫学的検討を行なった。また、F9生ワクチンを投与したネコの野外発症例から分離された2株については、遺伝子型別とワクチンに対する抵抗性について検討を試みている。

### 1. 遺伝子型の検討

1-1 遺伝子群の解析 77株のFCVは系統樹解析により高い確率で2遺伝子群に型別された。77株の

うち53株(69%)が遺伝子群Ⅰ(genogroupⅠ)に、24株(31%)が遺伝子群Ⅱ(genogroupⅡ)に属していた。群Ⅱはさらに2遺伝子亜群(subgenogroup;Ⅱa、Ⅱb)を形成し、亜群Ⅱaには13株(17%)、亜群Ⅱbには11株(14%)が属していた。このような明瞭なFCVの遺伝子型別は本研究において初めて明らかにされた。

**1-2 アミノ酸の系統樹解析** 上記の塩基配列をアミノ酸に変換して系統樹を作成した場合には、塩基配列による遺伝子群(Ⅰ、Ⅱ)と同じメンバーから構成される2群(ⅠAとⅡA)に大別される。しかし、群Ⅱにおいて示された2亜群(Ⅱa、Ⅱb)のブートストラップ値はアミノ酸配列による系統樹では53.6%と低い値を示すことから、明瞭な遺伝子亜群に分類されなかった。このような成績から、以下の遺伝子型別による疫学的検討には塩基配列を用いた系統樹解析が行われた。

**1-3 アミノ酸の比較** ⅠA、ⅡB、それぞれの群で共通するアミノ酸について比較したところ、F領域にある539番目のアミノ酸の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に、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異なっていた。このようなアミノ酸の違いによって型別が行える可能性が示された。

## 2. 疫学的検討

**2-1 国別の分布比較** 系統樹解析により遺伝子型別が可能となったので、ウイルスが分離された国別に遺伝子型の分布を比較検討した。群Ⅰにはドイツで分離された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株と外国で分離された株はいずれも群Ⅰに分布していた。これに対して、群Ⅱには外国で分離された株は見られなかった。また、日本で分離された株の23/47(49%)は群Ⅰに属し、群Ⅱには約半数の24/47(51%)が属していた。このように2群間の国別の分布には明らかな有意差が認められた( $P < 0.01$ )。この成績から群ⅠのFCVは日本を含む世界各地に広く分布しており、群Ⅱは日本に限局して分布することが明らかとなった。本研究は従来確認できなかった遺伝子型と地理的關係を初めて明らかにしている。

**2-2 日本で分離されたFCVの地域・県別分布の比較** 我が国で分離されたウイルスの地域性と遺伝子型の関連について検討した。九州地域で分離された64%が群Ⅰに36%が群Ⅱ、近畿では58%が群Ⅰに42%が群Ⅱ、関東では33%が群Ⅰに67%が群Ⅱにそれぞれ分布しており、地域間における有意差は見られなかった。また、各都道府県別においても群Ⅰ、群Ⅱおよび各亜群Ⅱa、Ⅱbの分布状況に有意差は認められなかった。

これらの成績から、ネコが人とともに国内を広く移動するため地域性が見られないのではないかと推察された。

**2-3 年代別による分布** 遺伝子型と分離された年代の関連について日本株を用いて検討したところ、遺伝子群と年代の関連は確認されなかった。

**2-4 相同性** 日本株20株と外国株の塩基配列について相同性を比較したところ、群Ⅰあるいは群Ⅱの中ではどちらの群でも約70%程度の相同性が認められ、群Ⅰと群Ⅱの間では大体60~70%の相同性がみられた。同様に、アミノ酸配列については群Ⅰあるいは群Ⅱの各々の中では約80%程度の相同性

が認められ、群Ⅰと群Ⅱの間では70%程度と両群の間で低い傾向がみられた。このような2群間の相同性の低さは遺伝子型の違いを裏付けている。また、ワクチン株のF9およびFCV255はいずれも群Ⅰに属し群Ⅱの日本株とは約70%程度の相同性を示し、遺伝的に隔たりが見られる。

**2-5 近縁性** 非常に高い近縁性を示すウイルスが、群Ⅰに属するアメリカ、カナダ、オーストラリアにおいて分離されている。これらのウイルスは分離された地域において数年間に渡り流行していたことを示している。群Ⅰに属している日本株にはこのような傾向は認められなかった。しかし、群Ⅱに属するウイルスには高い近縁性を持つものが見られ、狭い地域内において、あるいは別の地域にまたがって見られることから、ネコと人の移動と関連して流行しているようである。

**2-6 病原性との関連性** FCVの病原性と遺伝的相関性について検討するため、群Ⅰに形成された7つのクラスター（C1～C7）に属するウイルス株の病原性と近縁関係を比較した。下痢を起こした株はC2と亜群Ⅱbに属し、慢性胃炎を起こした株はC1とC4に属していた。急性胃炎、健康な個体に由来する株も異なったクラスターに属し、跛行を呈した株は同じC3に属していたが、遠い距離に位置していた。FCVの病原性と遺伝的関連性は従来との報告と同様に見られないことが示された。

また、兎ウイルス性出血病と似た致死性の病原性を示したFCV-Ari株と突然死を呈した症例から分離したFCV-B株、および実験感染で死亡を認めたH10株の塩基配列を比較したところ、それぞれ70.4%と74.7%の相同性を有し、遺伝子レベルやや低い関連性が示唆された。

**2-7 血清学的性状** 抗ワクチンF9株免疫猫血清に対する日本株（21株）の中和抗体価と遺伝子群の関連を検討した。群Ⅰに属する7株の抗体価の幾何平均値は $20.5 \pm 5.5$ （平均 $\pm$ SD）、群Ⅱの14株は $11.3 \pm 2.6$ （平均 $\pm$ SD）で、2群間の抗体価には顕著な有意差は認められず、中和抗体と遺伝的相関性は認められなかった。

**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** Sealは超可変領域（E領域、アミノ酸配列426-458）が中和抗体に結合部位と関連し、この領域が中和抗体に対する反応性と相関性を示すことを報告した。そこで、この報告に従いUPGMA法により系統樹解析を行った。FCVはⅠ-Ⅷのクラスターを形成し、構成メンバーの中和抗体に対する反応性を比較したところ、E領域と中和抗体に対する反応性は必ずしも一致せず、遺伝的相関性は示されなかった。

**2-9 E領域の系統解析** 上述のE領域について遺伝子型別ができるかどうかNJ法により系統樹解析したところ、形成されたクラスターのブートストラップ値が低い値を示したので、明瞭な遺伝子型はできなかった。この成績からE超可変領域は上述の遺伝子型別で示されたような地域性と関連しないようである。

### 3. ワクチン（F9株）に対する抵抗性の検討

ワクチン接種済みのネコの発症例から分離されたH10株とFCV-S株について遺伝子型を決めた。H10株は遺伝子群Ⅰに、FCV-S株は遺伝子群Ⅱに属していた。市販ワクチン（F9株）で免疫したネコに対してこの異なる遺伝子群の2株でそれぞれ攻撃し、感染防禦能について検討した。

**3-1 H10株に対する感染防御** 群Ⅰに属するH10株は、市販ワクチンF9株で免疫した免疫猫血清に

対して約80倍の低い中和抗体価を呈したので、H10株に対する抗体価を上げるため4頭のSPFネコに市販ワクチンを3回投与し、ワクチン未接種のネコ3頭と経鼻・経口投与を行なった。ワクチン未接種のネコが呼吸器症状と死亡を呈したのに対し、ワクチン投与群ではいずれも発症が抑制された。ウイルスの排泄は中和抗体価が高い個体では短期間で終わり、低い個体では長期に排泄された。このような成績から、H10株は抗体価が低い場合には感染を阻止できず長期にウイルスを排泄し、ワクチン抵抗株になる可能性を持つことが示された。

**3-2 FCV-S株に対する感染防御** FCV-S株の中和抗体価はF9株に比べ約10倍程度の低い値を示したので、4頭のネコに市販ワクチンを1回投与し、ワクチンを投与していないネコ2頭とともに攻撃を行った。市販ワクチン未接種群、接種群のどちらの個体にも体温の上昇、白血球数の増加、水様下痢を呈し、同じ様な症状が見られたが、呼吸器症状は起こさなかった。糞便へのウイルスの排泄は6日間以内に限定された。FCV-S株についてはワクチンによる顕著な防御効果が見られなかったことから、本ウイルスは市販ワクチンに抵抗性を示すものと思われた。ワクチンブレイクを起こさないように十分な防御効果を得るには、現在使用されている主要なワクチン株（F9株、FCV255株）は群Iに属しているので、群IIのウイルス株をワクチンに加えて併用する必要があるのではないかと提案している。

本研究はFCVが2種類の遺伝子型からなることを初めて明らかにし、群Iは広く世界に流行しており、群IIの系統は日本に限局して流行していることを示した。FCV感染症の今後の流行状況、ワクチンの開発に対する新たな展開、さらに群IIの系統の起源を探る手がかりを与えるものである。このように本研究はネコカリシウイルス学に貢献するところ大きく、博士（獣医学）号に相応しいものであると思われる。