

ネコカリシウイルス (FCV) の分子多様性に関する研究

Study on the molecular variety of Feline calicivirus (FCV)

原 元宣

麻布大学獣医学部獣医学科微生物学教室 II

Motonobu Hara

Department of Microbiology II, School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. To examine the mutations in the capsid region and antigenicity associated with FCV transmission and persistent infection in the field case, it was performed a phylogenetic analysis of a total of 22 strains: (6 strains isolated from 3-, 4-, and 5-month-old kittens that had been born in the same colony, and 2 strains isolated from 2 cats manifested latent infection (the first isolates), 14 strains isolated during three years post first isolation.

The neutralizing antibody titers for the first isolates decreased with a high negative correlation with the distance between capsid protein genes ($Y = -129.98X + 15.09$, $r = -0.84$). A high negative correlation was also found in the C and E regions. The neutralizing antibody titers of rabbit anti-F9 serum decreased with a high negative correlation with the genetic distance of the capsid region ($Y = -26.64X + 4.32$, $r = -0.90$). A correlation was also observed in region C and the 5'HVR of regions E and F.

The duration of virus secretion showed a high negative correlation with the distances between the origin and the amino acids in region B, region C, the 3'HVR of region E, and region F: the farther the distance between the origin and the amino acid became as a result of interindividual transmission, the shorter the duration of virus secretion. The slower the evolution of amino acids in persistently infected individual cats, the longer the duration of virus excretion, suggesting the involvement of region A.

1. 目的

Feline calicivirus (FCV)の5'HVR of EおよびC遺伝子領域はウイルスの中和に介在する抗体に対するターゲットと強い関連があり、5'HVR of Eは中和モノクローナル抗体に対するエピトープを含む。また、この領域を含む合成ペプチドは中和ポリクローナル抗体の形成を誘発することから、5'HVR of Eと領域Cはウイルス感染宿主体内で免疫回避に対するターゲットと考えられるが、抗原変異や遺伝子変異の関係は十分把握されていない。本研究は、野外FCV集団感染例 (Ao株) におけるFCVの猫体内と個体間

伝播、持続感染に伴うカプシド蛋白遺伝子の遺伝子距離と抗原変異の関連について検討した。

2. 方法

1. ウイルス分離

2001年6月30日に、一軒の家で飼育されていた34匹の猫にFCV感染が起きたのでこれらの猫についてウイルス分離を行った。分離ウイルス (1st isolates) をAo株 (Ao198-1, Ao199-1, Ao210-1, Ao212-1, Ao213-1, Ao214-1, Ao222-1, Ao224-1) とした。その後3年 (4回) に渡り追跡調査を行い、分離されたFCV (Ao199-2, Ao202-2, Ao210-2, Ao212-2, Ao213-2,

Ao214-2, Ao198-3, Ao199-3, Ao195-4, Ao214-4, Ao194-5, Ao195-5, Ao196-5, Ao214-5) について遺伝子解析を行った。

2. RT-PCR ; RT-PCR には新たにプライマー (Ao) を作成して定法に従った。

3. 免疫ウサギ血清の作製 ; Ao198-1 株と F9 株を用い、抗 Ao198-1 免疫ウサギ血清と抗 F9 免疫ウサギ血清を作製した。

4. 中和試験 (NT) ; 前述の方法に準じて抗 Ao198-1 免疫ウサギ血清あるいは抗 F9 免疫ウサギ血清を用い実施した。

3. 結果と考察

1) 分離ウイルスの系統樹解析 : 1st isolates の Ao8 株のプライマー領域のアミノ酸配列の系統樹解析により Ao198-1 株を origin として outgroup にした分子系統樹を作製すると、最後に発症した3ヶ月齢の仔猫から分離された Ao222-1, Ao224-1 株と Ao198-1 株が最も遠縁にあっていた。

全22分離株の Ao プライマー領域のアミノ酸配列について Ao198-1 を outgroup として作製した分子系統樹は、98.3% の高いブートストラップ値で2つのクラスターに分かれ、クラスター I には 1st isolates の不顕性感染をしていた猫から分離された Ao198-1, Ao199-1 株が含まれ、それ以外はクラスター II に含まれた。クラスター II はさらに、96.1% で、クラスター II a (Ao212-1) と、98.5% でクラスター II b, II c に分かれた。クラスター II b には、Ao212-1 株以外の仔猫からの分離ウイルスが含まれ、クラスター II c には、1年以降に分離された 3rd, 4th, 5th isolates から構成されていた。

2) 分離ウイルスのアミノ酸配列による Pair wise Distance と中和抗体価の相関 : Ao198-1 株と 1st isolates のアミノ酸配列における pair wise distance と抗 Ao198-1 ウサギ血清に対する中和抗体価の関係は回帰直線 $y = -129.98X + 15.092$ ($r = -0.84$) で顕著な交差性の低下を示した。A, B, D, F 領域の相関は 0.28, 0.66, 0.24, 0.50 と低く、C, E 領域は $r = 0.8$ 以上の高い相関を示した。C は $y = -15.83X + 13$ ($r = 0.81$)、5'HVR of E は $y = -41.53X + 14.69$ ($r = 0.80$) の回帰直線を示した。抗 F9 免疫ウサギ血清に対しては、回帰直線 $y = -26.64X + 4.32$ ($r = -0.90$)

で傾きは小さいが、相関が見られ、A, B, D, conE, 3'HVR of E の相関は 0.60, 0.65, 0.33, 0.45, 0.63 と低い。他の C, 5'HVR of E, F 領域は $r = 0.8$ 以上の高い相関を示した。C は $y = -3.54X + 4$ ($r = 0.94$)、5'HVR of E は $y = -8.00X + 4.16$ ($r = 0.80$) の回帰直線を示した。どの領域も、回帰直線の傾きは小さく、低い交差性を呈した。

3) 排泄期間とアミノ酸距離の関係 : Ao198-1 株と 1st isolates のアミノ酸配列による pair wise Distance と排泄期間の関係は、 $y = -221.6x + 12.967$ ($r = -0.97$) の回帰直線で示された。領域 A, D, 5'HVR of E, conE は $r = -0.68, -0.21, -0.53, -0.76$ と低い。領域 B で $y = -316.07x + 11.702$ ($r = -0.81$)、領域 C で $y = -27.75x + 12$ ($r = -0.99$)、3'HVR of E で $y = -54.958 + 10.211$ ($r = -0.89$)、領域 F で $y = -205.13x + 13.771$ ($r = -0.95$) と高い相関を呈した。

本野外発症例におけるウイルス分離状況から終息後も長期に持続感染する個体が存在すると体内でその持続感染ウイルスが変異し、他の個体に対して感染力が高くなり新たな感染が拡大することが示された。

Radford らも、コロニー内で集団感染が生じたときに分離した FCV 株は感染源の株に比べ、遺伝子距離が遠くなっていることを報告しているが、このような中和抗体との関係については述べていない。個体間伝播により origin とのアミノ酸距離が遠くなるほど排泄期間が短くなる傾向が見られた。逆に遺伝子距離が近い株に感染した個体ほど排泄期間が長く持続する傾向があった。このような排泄期間に関する報告は見られないが、本研究により領域 B, 領域 C, 3'HVR of E, 領域 F が強く関与していることが示唆された。また、ウイルスの持続感染個体内でのアミノ酸の進化速度と排泄期間の関係では、進化速度が遅いほど排泄期間が長くなる傾向が見られ、特に領域 A の関与が示唆された。Radford ら (1998) は感染実験において分離した FCV の進化速度について報告しているが、排泄期間との関係は示していない。さらに本症例について、追跡調査を行うことが出来たので、個体間伝播と持続感染個体内での変異状況を比較することが出来た。Kreuts ら (1998) も実験的持続感染において中和抗体に対する交差性の低下

と領域Eの関連について報告しているが、本論文で示すような個体間伝播により起きた特定部位におけるアミノ酸の置換、保存が引き続き持続感染でも見られ、新たな置換部位がさらに生じる点については述べられていない。特に、1年以上の長い持続感染を起こしたウイルスは大きな変異を起こし新たな個体に感染してゆっくり変異しながら長期の持続感染を起こすと考えられ、予防には持続感染が長期化しないようにすることが重要である。

4. 要 約

FCV感染野外例において、3年(5回)に渡るウイルス分離により22株分離され、originをoutgroupとした分子系統樹により、1-3年目(3-5回目)の分離ウイルスが一つの明瞭なクラスターを形成した。1st isolatesの中和抗体価とアミノ酸配列の距離の相関関係では、originからのアミノ酸距離が遠くなるほど交差性が低くなることが示された。FCVは個体を通過するに従い、アミノ酸距離が遠くなり、それに伴い中和抗体に対する交差性も低下するようである。排泄期間とoriginとのアミノ酸距離の関係では、領域B、領域C、3'HVR of E、領域Fで高い負の相関が見られた。個体間伝播をする時にoriginとのアミノ酸距離が遠くなるほど排泄期間が短くなる傾向が見られた。逆に距離に近い株に感染した個体ほど排泄期間が長く持続する傾向があった。1年以降に分離されたウイルス(3rd, 4th, 5th isolates)はさらに変異が顕著となり、それ以前に分離されたウイルスと異なるクラスターを形成し、排泄期間の長い個体が見られた。

文 献

- 1) Geisler K, Sheneider K, Truyen U. (2002) Mapping neutralizing and non-neutralizing epitopes on the capsid protein of *feline calicivirus*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 49, pp.55-60.
- 2) Guiver M, Littler E, Caul EO, Fox AJ. (1992) The cloning, sequencing and expression of a major antigenic region from the *feline calicivirus* capsid protein. J Gen Virol. 73, pp.2429-2433.
- 3) Johnson RP. (1992) Antigenic change in feline calicivirus during persistent infection. Can J Vet Res. 56, pp.326-330.
- 4) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N. (2002) Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology. 299, pp.225-239.
- 5) Kreuts LC, Johnson RP, Seal BS. (1998) Phenotypic and genotypic variation of feline calicivirus during persistent infection of cats. Vet Microbiol. 59, pp.229-236.
- 6) Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, 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, pp.281-300.
- 7) Radford AD, Turner PC, Bennett M, McArdle F, Dawson S, Glenn MA, Williams RA, Gaskell RM. (1998) Quasispecies evolution of a hyper variable region of feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. J of Gen Virol. 79, pp.1-10.
- 8) Radford AD, Bennett M, McArdle F, Dawson S, Turner PC, Williams RA, Glenn MA, Gaskell RM. (1999) Quasispecies evolution of a hyper variable region of feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. Vet Microbiol. 69, pp.67-68.
- 9) Radford AD, Dawson S, Ryvar R, Coyne K, Johnson DR, Cox MB, Acke EF, Addie DD, Gaskell RM. (2003) High genetic diversity of the immunodominant region of the feline calicivirus capsid gene in endemically infected cat colonies. Virus Genes. 27, pp.145-155.
- 10) Sato Y, Ohe K, Murakami M, Fukuyama M, Furuhashi K, Kishikawa S, Suzuki Y, Kiuchi A, Hara M, Ishikawa Y, Taneno A. (2002b) Phylogenetic analysis of field isolates of *feline calicivirus* (FCV) in Japan by sequencing part of its capsid gene. Vet Res Commun. 26, pp.205-219.
- 11) Sommerville LM, Radford AD, Glenn M, Dawson S, Gaskell CJ, Kelly DF, Cripps PJ, Porter CJ, Gaskell RM. (2002) DNA vaccination against feline calicivirus infection using a plasmid encoding the mature capsid protein. Vaccine. 20, pp.1787-1796.