

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)
— Sensitivity to rFeIFN —

原 元宣

麻布大学獣医学部獣医学科微生物学科II研究室

Motonobu Hara

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

Abstract. To examine the relationship between the FCV strains and rFeIFN sensitivity, the sensitivity of 47 field isolates to rFeIFN was determined. The PDD₅₀ values were distributed within the range $10^{1.1}$ - $10^{3.7}$, with a mean value of $10^{2.3} \pm 10^{0.64}$. Since 68.3 % of the PDD values fell in the range of the mean \pm standard deviation, the values in the range $10^{1.7}$ - $10^{2.9}$, the lower values, and the higher values were defined as representing moderate, low, and high sensitivity, respectively. Of the viruses belonging to C7 of G I, 3/5 (60 %) were highly sensitive, suggesting that rFeIFN is effective for them. Among the 15 vaccine breakdown strains, strain Fukuoka9 showed a low sensitivity, but strains ML89, T58, and N74 were highly sensitive, showing no association with vaccine breakdown. The amino acid sequence changes specific to the low rFeIFN-sensitive Fukuoka-9 strain were found, suggesting that these sites are involved in rFeIFN sensitivity.

1. 目的

FCVの治療に日本では、1994年から、組み換えネコインターフェロン (rFeIFN: インターキャット; 東レ) が使用されている (Uchino, et al, 1998)。

Fultonらは天然ネコIFN (NDV-FL) 及び、2種類の Recombinant human IFN (HuIFN- α A, HuIFN- α A/D) を用いて、FCV (F9株) に対する感受性を plaque assayで検定し、いずれのIFNも、plaque数を減少させ、有効性を示唆した (Fulton, and Bunge, 1985)。1990年、ネコの遺伝子組み換えIFN (rFeIFN) が開発され (Yanai, et al, 109th The Japanese Society of Veterinary Science, 1990)、In vitroの試験で、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV)、ネコ白血病ウイルス (FeLV)、ネコヘルペスウイルス (FHV)、FCVに抗ウイルス作用がある

ことが確認された (Yamamoto, K.J. et al, 110th The Japanese Society of Veterinary Science, 1991)。次いで、FCVを感染させたSPFネコに対する治療効果が認められ (Ninomiya, 1991)、野外の臨床試験でも、成果をあげ (Uchino, et al 1991)、FCIに対する有効率は、平均89.7%であり、FCVが検出された19例のうちrFeIFNが無効であったものは2症例であった。インターキャットの野外FCI治療効果の調査により、有効率は90%と高いが、無効例も5/160の低い割合であるが見られている (Uchino et al, 1998)。一方、HCVのようなほかのウイルスでは遺伝子型による感受性の違いが報告されているが、rFeIFNのFCV野外分離株に対する報告は見られないので検討した。

2. 方法

使用ウイルス

1989-2001年の間に分離されたFCV44株とF9株(ATCCVR782), CFI/68株(ATCCVR654), FCV-255株の計47株を用いた。

rFeIFN感受性試験

インターフェロン感受性試験は、Wagner (1961)により確立され、Lindenmann & Gifford (1963)により定量性が確認されたブラック形成法(寒天重層間接法)を一部修飾して、行った。インターフェロンは、市販の“インターキャット(共立商事)”をPBS(-)に溶かし 10^7 単位に調整し、単層培養されたCRFK細胞に各希釈(0, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 U/ml)のIFNを1ml接種し、37℃で放置する。24時間後、IFN溶液を除去し、30-100PFU/dishのウイルスを接種し37℃で、2時間吸着後、ウイルス液を除去し、Plaque agarを重層する。Plaque agarは、1.8% Sea plaque agar (Cambrex Bio Science Rockland, Inc)に同量の2倍の濃度のイーグルMEMと10%仔牛血清、1%ニュートラルレッド(和光純薬(株))を添加して作成された。37℃で72時間培養し、ギムザ液(Giemsa's solution)(メルク・ジャパン(株))で染色し、plaqueの直径と数を測定し、50% plaque-depressing dose (PDD₅₀)を算出した。各IFN希釈における対照と比較したブラック数の比率をp/P、ブラックの直径の平均比をd/Dとすると、ウイルス増殖能の比率は $p/P \times (d/D)^2$ となる。この比をIFN希釈率の逆数の指数にプロットして、回帰直線を作成し、50%終末希釈の逆数をPDD₅₀とした(Wagner, 1961; Lindenmann & Gifford, 1963)。各分離株について2回以上試験を行い、その平均をPDD₅₀した。

遺伝子系統解析

遺伝子系統解析は、Satoら(Sato et al, 2002a)の報告にある14株に33株を加え、Clustal Xのソフトウェアを用いて行った。系統樹はヌクレオチド配列をNJ法で行い、分子系統樹の枝の長さは各々の距離に比例しており、1000回の反復抽出の後に形成された。(Sato et al. 2002b)

統計分析

rFeIFNのPDD₅₀値とGenogroupの比較には、

Mann-Whitney's U test, Kruskal-Wallis testを用いた。

3. 結果と考察

rFeIFN感受性試験

F9株を用い、rFeIFN濃度とPDD₅₀の相関を検討した。 $y = 0.14x + 0.10$ の相関を呈し、PDD₅₀は $10^{2.9}$ を示し、 $10^{4.1}$ (約12589)単位に相当した。47株のPDD₅₀値は、 $10^{1.1}$ - $10^{3.7}$ の範囲に正規分布した。平均値は2.3で標準偏差は0.64で、平均±標準偏差の範囲に68.3%含まれるので、これを中感受性とし、それよりも低いものを低感受性、高いものを高感受性とした。

分離系統樹解析

ヌクレオチド配列を用いたphylogenetic analysisで、Genogroup I (G I), Genogroup II (G II)に分かれ、G IIはさらにクラスターII a, II bに分かれた。G Iは、7つのクラスター(C1-C7)に分かれた(Sato et al, 2002a)。

GenogroupとrFeIFN感受性の関係

各株の遺伝子群とIFN感受性の比較をした。G Iは低感受性が16%(4/25)、中感受性が68%(17/25)、高感受性が16%(4/25)含まれた。それに対し、G IIは低感受性が23%(5/22)、中感受性が72%(16/22)、高感受性が5%(1/22)含まれた。また、IFN感受性とクラスター(C1-C7, II a, II b)の比較では、IFN感受性はクラスターによって差が見られ、特にC7に含まれる株は高感受性株が多く含まれる傾向が見られた。また、ワクチンブレイク株4株(FCV-B, S1, Ao, H10)のPDD₅₀値は、 $10^{2.7}$ - $10^{2.9}$ の範囲にあり、中感受性を示し、低感受性株は見られなかった。

rFeIFNの感受性を検討するために、rFeIFNの希釈倍率とplaqueの数と直径を加味して比較する方法を用いたところ、高い相関性が示された。rFeIFN濃度と全ての株のPDD₅₀値は反比例したが、株によっては、直径が減少するものと、ほとんど変わらないものが認められ、今回のように多くの野外株の感受性を比較するにはplaque数のみによる検定(Fulton and Bunge 1985)やTCID₅₀値(Mochizuki et al., 1994)を指標にするよりも、適しているのではないかと思われる。

Uchino (1998)らは、rFeIFN(インターキャット)

の有効率（著効；13%，有効；77%）は90%だったと報告しているが、残りの10%（やや有効；6%，無効；3%，悪化；1%）は効果があまり見られないということである（T. Uchino et al, 1998）。本研究では、9/47（19%）が低感受性を呈し、Uchino（1998）らの無効率に比べやや高い傾向が見られたが、Uchino（1998）らの調査では、ウイルス分離はしておらず、有効率は症状のみで行っているため、ウイルス排泄をしている数は無効率より高いかもしれない。Mochizukiらは、rFeIFNは生体内での抗ウイルス作用が用量に依存しているとともに、感受性がウイルスの種類や宿主細胞系に依存していることを報告したが（Mochizuki et al., 1994）、rFeIFNに対する野外ウイルスの感受性については触れていない。実際の治療では投与IFNの作用の他に感染個体において免疫機能を伴う治癒機転が働くものと思われる。今回検査した株に全く感受性を示さなかった株は検出されなかったが、感受性に差が見られるので本剤による治療で効果が見られないような場合にこのような低感受性のウイルスの関与が推察され、今後、さらに治療効果との関連について検討する必要があるだろう。

rFeIFNの感受性とGenogroupingの関係で、IFN治療として適用されている人のC型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus; HCV）は4つのGenotypeに分かれ、そのうち、Genotype IIIとIVに属すウイルスはIFNが効きやすく、Genotype IIに属すウイルスはIFNに無効であるものが多いと報告されている（E. Orito, et al., 1994）。今回のFCVでは中感受性と高感受性を合わせると、77%となり、HCVの報告に見られるほど顕著とは言えないようである。しかし、G IのC7に属すウイルスは3/5（60%）が高感受性だったので、IFNが効きやすい傾向が見られ、rFeIFNの感受性とGenogroupingの関連性はさらなる研究が期待される。一部ワクチンブレイクダウン株について（Ohe. K., et al, 2005）rFeIFNの感受性を見ているが、低感受性株は見られず、ワクチンブレイクダウンとの関連は見られない。この点については興味深いところであり、さらに例数を増やし、検討しているところである。

4. 要 約

野外株44株とF9, 255, CFI株を含む計47株につ

いて50% plaque-depressing dose (PDD₅₀)によりrFeIFNに対する感受性を比較した。

47株のPDD₅₀は101.1～103.7の範囲に正規分布していた。これらの平均値±標準偏差（2.3±0.64）の範囲に含まれるものを中感受性とし、それよりも低いものを低感受性、高いものを高感受性とし、各株の感受性を遺伝子群により比較すると、G Iは低感受性が16%（4/25）、中感受性が68%（17/25）、高感受性が16%（4/25）含まれ、G IIは低感受性が23%（5/22）、中感受性が72%（16/22）、高感受性が5%（1/22）含まれた。G IIの方に低感受性株が多く含まれる傾向が見られ、F9株が含まれるG Iのクラスター（C-7）に含まれる3/5（60%）株が高感受性株を示した。ワクチンブレイクダウン由来株は中感受性を示すものが多く、低感受性株が見られないことからブレイクにはrFeIFN感受性の関与は低いことが示唆された。

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.