

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

???Nanae Myouji

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

Abstract. It continues from the past, in an amino acid sequence of an Ao primer domain of all isolates, 2 genogroups were clustered with the bootstrap value that 98.3 % were high, and 198 - 1 and 199-1 strains of 1st isolates were included in Genogroup I in the phylogenetic tree and were included in Genogroup II besides it. Genogroup II was divided into three Genogroups II b, II c with II a (212-1) and probability of 98.5 % with probability of 96.1 % more. Isolates from a kitten except 212-1 strain were included in Genogroup II b, and 3rd, 4th, 5th isolates was included in Genogroup II c for long period. Characteristic changes associated with inter individual transmission were found in 1 site in region C in which the neutralizing epitope resided (N at position 399 to D), and in 2 sites in the 5'HVR of region E (E at position 428 to K, and A at position 432 to T). Among the sites of substitutions specific to persistent infection, 4 sites in the 5'HVR of region E in which the neutralizing epitope resided (D to H at position 434, G to E at position 440, A to K at position 450, and V to T at position 455) may be related to escape mutation to escape from the antibody production.

In addition, a strain isolated from the cat which died suddenly is different from high pathogenic strain reported previously, and it belongs to GA II, and it is different from field strains described above, and it is necessary to study further with a vaccine break more.

1. 目 的

ネコカリシウイルス (FCV) 野外分離株の分子多様性について継続して検討した。ワクチンにより予防されていた閉鎖コロニーにおいて生まれた5, 4, 3月齢の新生仔猫が順次FCV感染症により呼吸器病を起こしたので、これらから分離したFCVと同居して不顕性感染を呈していた1歳のネコから分離したFCVのキャプシド領域の遺伝子について系統解析を行い、新生児猫への伝播・通過に伴うキャプシド遺伝子のCおよびE領域のアミノ酸の変化と抗原変異の関連について検討した。その後、4回の追跡調査を行い、FCVが長期に分離されたのでFCVのゲノム変

化について検討した。また、別のワクチンブレイク、突然死した猫から分離した株の性状についても他の野外株と比較検討した。

2. 方 法

ウイルス分離

2001年6月30日に、千葉県の一軒の家で新規の導入や外出をさせない閉鎖コロニーで飼育されていた34匹の猫にFCV集団感染が起こり、目、鼻、口腔粘膜の拭い液を採取した。さらにその後4回に渡り追跡調査を行い、分離されたFCVを本実験に用いた。また、ワクチンブレイク、突然死した猫から以前分離した株についてクローニングを行った。

RT-PCR および塩基配列の決定

RT-PCR には Ao のプライマーを用い定法に従い塩基配列の決定をおこない、NJ 法により系統樹を作成して群別した。

中和試験 (NT)

100 ml の Ao198-1 株と F9 株のウイルス液を上述の方法で部分精製し、それぞれ 1 ml に濃縮し、フロイドの完全アジュバンドと混合して、specific pathogen-free (SPF) ウサギに、3 回筋肉内投与した。1.5 ヶ月後に血液を集め、抗 Ao198-1 免疫ウサギ血清と抗 F9 免疫ウサギ血清を作成した。

200TCID₅₀/0.1 ml のウイルス浮遊液と同量の抗 Ao198-1 免疫ウサギ血清あるいは抗 F9 免疫ウサギ血清を 37℃ 2 時間反応した後、96 穴プレートに培養した CRFK 細胞に接種した。CPE は 3-7 日後に判定し、ウイルスの中和抗体価を算出した。

3. 結果と考察

全分離株の Ao プライマー領域のアミノ酸配列において、198-1 を outgroup として作成した分子系統樹では、98.3 % の高いブートストラップ値で 2genogroup に分かれ、Genogroup I には 1st isolates の不顕性感染をしていたネコから分離された 198-1、199-1 株が含まれ、それ以外が、Genogroup II に含まれた。Genogroup II はさらに、96.1 % の確率で Genogroup II a (212-1) と、98.5 % の確率で Genogroup II b, II c に分かれた。Genogroup II b には、212-1 株以外の仔猫からの分離ウイルスが含まれ、Genogroup II c には、3rd, 4th, 5th isolates が含まれた。これにより短期の個体間伝播ではウイルス排泄期間が短くなるが、長期になると持続感染となり長期の排泄が見られこのアミノ酸の変化の相違がクラスターに反映されるようである。

分離ウイルスのアミノ酸配列によるアライメントによる個体間伝播時と持続感染時の比較

個体間伝播 (198-1 と 222-1, 224-1 を比較)。Region A で 2 箇所 (79 番目 M から I, 120 番目 I から T), Region B で 4 箇所 (333 番目 V から A, 345 番目 N から T, 363 番目 I から V, 392 番目 A から T), Region C で 2 箇所 (398 番目 S から K, 399 番目 N から D), Region D で 0 箇所, 5'hvrE で 6 箇所 (428 番目 E から K, 432 番目 A から T, 441 番目 I から T, 446 番目 R

から I, 458 番目 E から K), conE で 3 箇所 (464 番目 K から R, 481 番目 I から V, 487 番目 I から V), 3'hvrE で 6 箇所 (491 番目 S から N, 493 番目 S から I, 495 番目 T から N, 496 番目 K から S, 518 番目 A から T, 519 番目 E から D), Region F で 7 箇所 (529 番目 T から M, 539 番目 V から A, 546 番目 R から K, 577 番目 V から I, 578 番目 K から N, 615 番目 B から N, 636 番目 I から V) 存在し、合計 29 箇所だった。持続感染 (未だ終息していないもの: 214-1 と 214-5 を比較)

Region A で 6 箇所 (50 番目 T から S, 59 番目 L から H, 60 番目 Q から E, 73 番目 F から S, 117 番目 S から N, 120 番目 I から T), Region B で 4 箇所 (318 番目 P から L, 331 番目 M から V, 337 番目 I から V, 363 番目 V から I), Region C で 3 箇所 (398 番目 G から K, 399 番目 G から N, 401 番目 A から E), Region D で 0 箇所, 5'hvrE で 9 箇所 (428 番目 K から R, 430 番目 T から I, 432 番目 S から A, 441 番目 T から S, 446 番目 K から V, 449 番目 Q から H, 450 番目 G から T, 455 番目 V から T, 456 番目 V から E), conE で 3 箇所 (479 番目 T から K, 481 番目 V から I, 487 番目 V から I), 3'hvrE で 7 箇所 (491 番目 S から N, 493 番目 I から N, 494 番目 E から G, 496 番目 S から V, 509 番目 V から I, 517 番目 K から N, 518 番目 A から E), Region F で 3 箇所 (568 番目 K から R, 578 番目 K から G, 579 番目 T から G) 存在し、合計 35 箇所だった。

個体間伝播 (198-1 と 222-1, 224-1 を比較) と持続感染 (終息していないもの: 214-1 と 214-5 を比較) に共通する変異

アミノ酸が共通するものは、Region A で 2 箇所 (79 番目 I, 120 番目 T), Region B で 2 箇所 (345 番目 T, 392 番目 T), Region C で 1 箇所 (398 番目 K), Region D ではなく、5'hvrE で 1 箇所 (458 番目 K), conE ではなく、3'hvrE で 4 箇所 (491 番目 N, 494 番目 G, 495 番目 N, 519 番目 D), Region F で 4 箇所 (529 番目 M, 539 番目 A, 546 番目 K, 577 番目 I) 存在し、合計 14 箇所だった。アミノ酸の種類を加味しなければ、個体間伝播時と持続感染中の変異部位は、Region A で 2 箇所 (79 番目, 120 番目), Region B で 3 箇所 (345 番目, 363 番目, 392 番目), Region C で 2 箇所 (398 番目, 399 番目), Region D ではな

く、5'hvrEで6箇所(428番目, 432番目, 441番目, 446番目, 450番目, 458番目), conEで3箇所(464番目, 481番目, 487番目), 3'hvrEで6箇所(491番目, 493番目, 495番目, 496番目, 518番目, 519番目), Region Fで5箇所(529番目, 539番目, 546番目, 577番目, 578番目)存在し, 合計27箇所だった。

個体間伝播(198-1と222-1, 224-1を比較)と持続感染(終息していないもの: 214-1と214-5を比較)に共通していない変異

個体間伝播特有のアミノ酸変異は, Region Bの333番目(VからA)とRegion Fの615番目(BからN)の2箇所のみだった。それに対し, 持続感染(終息していないもの: 214)特有のアミノ酸変異は, Region Aで5箇所(50番目TからS, 59番目LからH, 60番目QからE, 73番目FからS, 117番目SからN), Region Bで3箇所(318番目PからL, 331番目MからV, 337番目IからV), Region Cで1箇所(401番目AからE), Region Dではなく, 5'hvrEで5箇所(430番目TからI, 441番目TからS, 449番目QからH, 455番目VからT, 456番目VからE), conEで1箇所(479番目TからK), 3'hvrEで1箇所(509番目VからI), Region Fで2箇所(568番目KからR, 579番目TからG)存在し, 合計16箇所だった。これらのアミノ酸の変化の相違がクラスターに反映されるように排泄期間と関連するようである。持続感染と関連する置換部位として中和エピトープの存在する5'HVRの4箇所(434; D-H, 440: G-E, 450: A-K, 455: V-T)が関連する可能性を示唆している。

4. 要 約

長期に渡る個体あるいは個体間のウイルス感染によりアミノ酸の変化の相違がクラスターに反映され排泄期間と関連するようである。持続感染と関連する置換部位として中和エピトープの存在する5'HVRの4箇所(434; D-H, 440: G-E, 450: A-K, 455: V-T)が関連している可能性が示唆された。また, 突然死した猫から分離された株は以前報告された高病原性株と異なり, GA IIに属し上述の株とも異なっており, ワクチンブレイクとともにさら野外株の分子疫学的研究について検討する予定で

ある。

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.