

—最近における動物衛生研究情報 (X)—

西ナイルウイルスの血清学的検査で陽性を示す
日本脳炎ウイルスワクチン接種馬血清の
ウイルス中和法による識別

清水眞也[†] 広田次郎 (動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域)



清水眞也

1 はじめに

西ナイルウイルス (WNV) は鳥と蚊の間で感染環が維持され、蚊を介して人や馬に感染し、発熱や脳炎を引き起こす。わが国は WNV 非汚染国であるが、「新興感染症・輸入感染症」として重要な疾患である。

1999年の米国ニューヨーク市において WNV の侵入が確認されて以来、同ウイルスの非汚染地域であった米国において流行が継続拡大している。北米の流行では従来の WNV 感染と異なり、感染鳥の発病や死亡、馬と人における流行、重篤な脳炎患者が発生している。アメリカ大陸は WNV の非汚染地域であったため、当初、1999年のニューヨーク市地域での発生例では、セントルイス脳炎ウイルスの感染が疑われたが、鳥での発病が多いことや PCR の結果から WNV が原因であることが判明した。WNV の流行地域はアメリカ周辺国のカナダ、メキシコ、中南米へと急速に浸潤拡大している。また、シベリアにおいても同病の発生が確認された。わが国とこれらの地域とは、野鳥、人、家畜の往来があり、本ウイルスの侵入が懸念されている。本邦に存在する蚊も WNV を伝播する能力があることが報告されていることから、WNV 非汚染国であるわが国へ本ウイルスが侵入した場合、WNV 感染症の急速な拡大が予想されている。なお、従来 WNV 感染では重篤な疾病を発症しないものと考えられていたが、アメリカでの WNV 感染症では重篤な症状を示す例が多く報告されており、その原因としてアメリカで流行している WNV 株は従来の株と遺伝子配列が異なる部位があることから病原性が高くなっていると考えられている。

WNV において死亡した標本からのウイルス分離あるいは PCR によるウイルスの検出は効率よく実施できる

が、生体からのウイルスの検出は困難である。これは、死亡例以外では WNV に感染しても WNV 血症の期間は通常 5 日程度と短く、この期間以外は、ウイルス分離や PCR による検出は困難であるためである。一方、WNV に感染すると長期間にわたり抗体価が持続するため、血清診断法は WNV 感染において重要で有効な方法である。

WNV はフラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎血清型群ウイルスに属している。日本脳炎血清型群ウイルスには、日本脳炎ウイルス (JEV)、WNV、マレーバレー脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス等が含まれている。この群に属するウイルスには特に高い共通抗原性が認められ、感染血清や免疫血清を用いた血清反応において高度の交差性が報告されている。このため、これらのウイルス種ごとの感染を血清診断で区別する困難性が指摘されている。

わが国には、WNV と高い共通抗原性が認められる JEV が常在しており、JEV の発症を防ぐため、国内のほとんどの馬には JEV ワクチンが接種されている。しかし、JEV ワクチン接種馬血清を WNV の血清診断法で測定した場合、どの程度交差反応が起こるか、WNV 感染との鑑別が可能であるか、さらに、どの血清診断法が有効であるかについての情報は無い。

そこで、JEV ワクチン接種馬血清における WNV のウイルス中和試験 (PRNT)、血球凝集阻止試験 (HI) および ELISA の 3 種類の血清診断法における交差反応について検討した。

2 材料と方法

18頭の JEV ワクチン接種馬 (平均年齢 13.5 歳、8 ~ 20 歳) および対照として 9 頭の JEV ワクチン未接種馬 (1 歳以下) の血清を採取し、JEV、WNV 各々について PRNT、HI、ELISA による各抗体価を求めた。PRNT

[†] 連絡責任者：清水眞也 (独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7833 E-mail : shimizux@affrc.go.jp

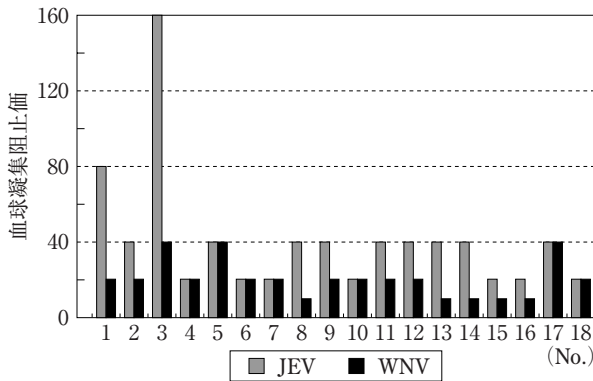


図1 日本脳炎ワクチン接種馬の西ナイルウイルス赤血球凝集阻止反応

日本脳炎ワクチン接種馬血清は、西ナイルウイルス赤血球凝集阻止反応で高い交差性を示している。

(JEV：日本脳炎ウイルス，WNV：ウエストナイルウイルス)

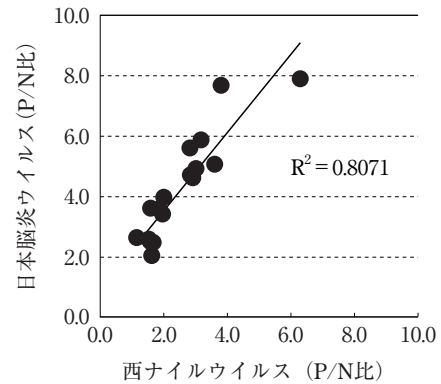


図2 日本脳炎ワクチン接種馬血清における西ナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルス抗原を用いたELISA

日本脳炎ワクチン接種馬血清は、日本脳炎ウイルス抗原に反応するとともに西ナイルウイルス抗原にも同程度に反応する。

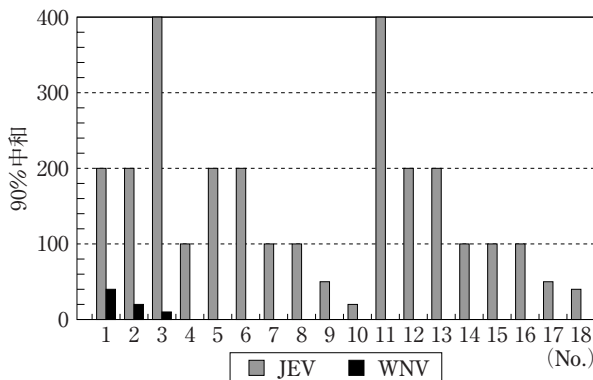
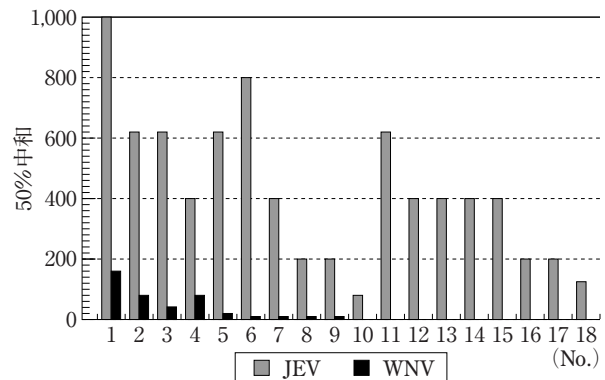


図3 日本脳炎ワクチン接種馬血清の西ナイルウイルス中和試験

日本脳炎ワクチン接種馬血清は、西ナイルウイルス中和抗体法で、90%中和で16.7%、50%中和で50%が陽性を示すが、いずれも日本脳炎ウイルス中和抗体価に比して低く、5倍以上の差があるので、区別可能である。



及びHIは従来法により実施し、どちらも10倍以上を陽性とした。ELISAは、JEVおよびWNVを不活化後、シヨ糖密度勾配超遠心法で精製し、ELISAプレートに固着し、被検馬血清を反応させ、ペルオキシターゼ標識抗馬イムノグロブリン抗体で検出し、P/N比(サンプルのOD値/陰性サンプル平均OD値)2倍以上を陽性とした。

3 結 果

JEVワクチン未接種馬血清は、WNV、JEVのPRNT、HI、ELISAのいずれも陰性であった。一方、JEVワクチン接種馬血清はJEVのPRNT、HI、ELISAにおいてすべて陽性を示した。

HIにおいてJEVワクチン接種馬血清は、JEV-HIに対し $\times 20$ - $\times 160$ の間でHI価を示す一方、WNV-HIにおいては、5例が1:10、14例が1:20以上のHI価を示した。JEVに対する抗体価が高い傾向が確認されたが、その比は1:1から1:4であった(図1)。

ELISAではJEVワクチン接種馬血清は、WNVにおいて50%(9/18)で陽性を示した。P/N比のJEV-ELISA/WNV-ELISAは1.23-2.27で、その相関係数は、 $R^2 = 0.8071$ であった(図2)。

WNV-PRNTにおいてJEVワクチン接種馬血清は、90%中和では16.7%(3/18)に、50%中和では50.0%(9/18)に陽性が認められ、交差反応が確認された。しかし、いずれの陽性例においても、JEVに対する中和抗体価が5倍以上高かった(図3)。

4 考 察

地球温暖化による世界的な気候変動は、これまで未侵入であった地域への新たな病原体の侵入、重大な疾病による被害の拡大を招くと予測されている。特に、節足動物媒介性のアルボウイルスの被害の増大が予測されている。WNVは、世界的に拡大の予測されているアルボウイルスの一つである。現在のところわが国へ侵入していないと考えられるが、日本国内に存在する蚊もWNVを

伝播することが報告されており、WNVが本邦に侵入した場合、被害が拡大することが予測されている。わが国にはJEVが常在しており、国内のほとんどの馬にはJEVワクチンが接種されている。JEVとWNVは血清学的には類似性が高いため、血清反応で交差反応が起こることが知られているが、JEVワクチン接種馬血清をWNVの血清診断法で測定した際、どの程度の交差反応が起こるか不明であった。このためWNVが日本国内に侵入した場合、どの血清学的診断法が有効であるかを明らかにしておく必要がある。そこで、JEVワクチン接種馬におけるWNVのPRNT、HI及びELISAの交差反応について明らかにした。

HIにおいては、JEVワクチン接種馬血清はすべての個体がWNV-HIに陽性を示した。また、JEV-HI/WNV-HI比は1.4と低く、HIの抗体価の比較による区別は困難であることが判明した。

ELISAにおいては、JEVワクチン接種馬血清は、JEV-ELISAおよびWNV-ELISAに対する反応性はJEV-ELISAの方が反応が高い傾向があるが、P/N比のJEV-ELISA/WNV-ELISAは1.23-2.27で明瞭な差が無く、さらに相関係数も0.8071と高かった。このため、ELISAによる判別は困難であることが判明した。

PRNTにおいては、JEVワクチン接種馬血清は、WNVの90%中和では16.7% (3/18) で陽性が認められ、50%中和では50.0% (9/18) で陽性が見られた。WNVとJEVの中和抗体価の比は、90%および50%中和ともに最も比の小さい個体でも5倍あり、通常診断基準として用いられる4倍以上の差が認められた。一般に

フラビウイルス感染血清は中和抗体価が4倍以上あると種特異的であると考えられており、中和抗体価の比を比較することで、JEVとWNVを血清学的に区別することは可能と考えられる。なお、抗JEV中和抗体価の高低とWNV中和抗体価の間に相関は認められなかった。動物実験モデルでJEVワクチンによりWNVの感染を防御する可能性を示唆する報告があるが、JEVワクチン接種馬の血清において、50%中和においてもWNVに対する中和抗体のない馬が半数存在することから、国内にWNVが侵入した場合、JEVワクチン接種馬においても、WNVに感染することが予測される。

今回の結果から、JEVワクチン接種動物血清は、ELISA及びHIにおいてWNVと高度に交差し、同法では判別が困難であることが示された。一方、PRNTにより、JEVワクチン接種動物とWNV感染を区別することが可能であることが判明した。しかし、PRNTではWNVの生ウイルスを取り扱う必要があり、本邦ではP3施設を必要とするため実用的ではない。WNVの未汚染国であるわが国への侵入を監視するためには、わが国に常在するJEVと未侵入のWNV感染を明確に区別する迅速簡便な血清診断法の開発が急務である。

上記は、次の論文にて発表した。

Hirota J, Nishi H, Matsuda H, Tsunemitsu H, Shimizu S : Cross-Reactivity of Japanese Encephalitis Virus-Vaccinated Horse Sera in Serodiagnosis of West Nile Virus, *J Vet Med Sci*, 72(3), 369-372 (2010)