

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 廣田 次郎

---

ウエストナイルウイルス(WNV)は近年急速にその生息域を拡大し、ヒトやウマ、野鳥、特にカラス科の野鳥に対し毒性が強く、流行期には多数の野鳥を死亡させるなど、多大な被害を与えている。また、極東シベリアや北海道において WNV 抗体陽性の野鳥が見つかるなど、日本周辺でも分布拡大が続いていることが示唆されている。野鳥での流行はヒトやウマよりも早期に生じる事が知られているため、死亡野鳥調査は非常に有効である。しかし多くの野鳥やほ乳類における WNV 感染のほとんどは不顕性感染であり、ウイルスも数日で速やかに体内から淘汰されるため、これらの動物のサーベイランスには血清学的診断法が用いられている。しかし、日本を含む東アジアでは WNV と近縁の日本脳炎ウイルス(JEV)が蔓延しており、JEV と WNV は、構造タンパク質のアミノ酸配列が約 77%共通であるため、様々な血清診断法で交叉反応が生ずることが知られている。そこで正確な疫学調査結果を得るためには、この交叉反応の影響を受けない手法の確立が求められている。また、死亡野鳥の WNV の検出には、PCR や免疫組織染色法が用いられるが、免疫組織染色に用いるポリクローナル抗体の交叉反応性も問題となっており、WNV 特異抗体が必要とされている。これらの背景から、本研究では、JEV との交叉反応の影響を明らかにし、WNV に対する正確な血清診断法および抗原検出法を確立することを目的とした。

これまで各家畜における種々の血清診断法での交叉反応は報告が無かった。そこでまず、ウマおよびニワトリについて、従来から用いられている血清診断法である indirect ELISA、赤血球凝集阻害反応試験(HI)、中和法における交叉反応を調査した。ウマでは、indirect ELISA および HI において高度な交叉反応が見られた。中和法はこれらの手法よりも特異性が高かったが、90%プラーク減少基準では 16.7%のウマが、50%プラーク減少基準では 50%のウマが WNV 中和抗体陽性と判定された。一方 JEV に対する中和抗体価を、WNV に対する中和抗体価と比較すると、5 倍以上の値を示していた。JEV ワクチン接種馬において WNV のサーベイランスを行う際には、WNV と JEV に対する中和抗体価を同時に測定し、比較することで JEV ワクチン接種馬と判別できると考えられた。ニワトリでは、indirect ELISA において交叉反応は見られたが、JEV を抗原とした indirect ELISA の値は、WNV を抗原とした indirect ELISA の値よりも有意に高かった。一方、HI と 90%プラーク減少基準を用いた中和法では交叉反応は示さなかった。これによりニワトリにおいて、HI と中和法は診断法として用いることができる可能性が示唆された。

以上の様に、動物種によっては一般的な血清診断法でも診断は可能であった。しかし、

一般的な診断法は時間がかかる上に処理効率も低い。このため本研究では WNV 特異的モノクローナル抗体(mAb)を作出し、これらの抗体を用いた二つの効率的な競合 ELISA を確立した。

第一は、100 倍希釈血清で診断可能な WNV 特異的高感度競合 ELISA である。既存の競合 ELISA は 5-10 倍の低希釈血清を用いる必要があり、野鳥や小動物への適用は困難であった。本競合 ELISA を用いる事で、野鳥へのダメージを最小限に抑えた高感度なサーベイランスが可能となった。

第二は、インド株やエジプト株、オーストラリア株などに対する抗体も検出可能な競合 ELISA である。近年、アメリカのみならず、ヨーロッパやシベリアでも病原性の高い WNV が発生している。しかしながら既存の Blocking ELISA は、複数の WNV 株に対する抗体の検出が検討されていない。本競合 ELISA の開発によって、より広い地域での効率的な WNV サーベイランスが可能となった。

さらに WNV の死亡野鳥調査において有効な免疫組織染色法を開発した。現在用いられているポリクローナル抗体は、JEV にも交叉反応を示すため、新たに免疫組織染色に適用可能な mAb を作出した。得られた mAb は WNV 感染組織をポリクローナル抗体と同様に強く染色したが、JEV 感染組織には全く反応しなかった。本抗体を用いる事で、公衆衛生的に非常に重要とされる、死亡野鳥調査を効率的に行う事が可能となった。

以上の通り本研究では、ウマおよびニワトリにおける血清学的交叉反応性を明らかにし、抗 JEV 抗体に影響を受けない WNV 特異的競合 ELISA を確立した。またホルマリン固定パラフィン切片に使用可能な WNV 特異的 mAb を確立したことにより、効率的な死亡野鳥調査が可能となった。本研究により確立した、WNV 特異的競合 ELISA や、免疫組織染色に有効な WNV 特異的 mAb は、JEV 蔓延地域における WNV のサーベイランスに極めて有効であり、本領域研究に大きく貢献すると考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。