

## 学位論文題名

## Studies on the Diagnosis and Prevention of Equine Influenza

(ウマインフルエンザの診断と予防に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

近年、ウマの国際空輸移動が頻繁になるに伴い、ウマインフルエンザウイルスが国内に持ち込まれる機会が増加している。したがって、ウマインフルエンザの発生と流行を予防するために、さらに検疫を強化するとともに効果的なワクチンを用意する必要がある。ウマH3N8インフルエンザウイルスは1963年に初めて分離されて以来、世界各地で流行を引き起こしてきた。この間にウイルスの抗原性が変化したと推定されるが、抗原変異の詳細は不明である。本研究の目的は、第一に、インフルエンザワクチン接種馬群の中からインフルエンザウイルス感染個体を迅速に摘発する診断法を開発することであり、第二に、現に流行を引き起こしているウイルスに抗原性が近縁で、その感染をより効果的に防御するワクチンを用意するために、ウマH3N8インフルエンザウイルスの抗原変異の実態を明らかにすることである。

まず、不活化インフルエンザワクチン接種馬群の中からウイルス感染馬を摘発する方法を開発するため、ウイルス感染細胞にのみ発現される非構造タンパク (NS1) に着目した。A/equine/Miami/1/63 (H3N8) 株のNS1遺伝子をクローニングし、大腸菌でNS1を発現させた。この組み換えNS1はウマ、トリおよびヒトのH3インフルエンザウイルスのそれらと抗原性が共通していることを確認した。A/Aichi/2/68 (H3N2) 株を実験感染させたマウスの血清中に抗NS1抗体が検出された。一方、不活化ウイルスを皮下に接種したマウスの血清中には抗NS1抗体が検出されなかった。

A/equine/Kentucky/1/81 (H3N8) およびA/equine/La Plata/93 (H3N8) 株をそれぞれ実験感染させたウマの血清中に抗NS1抗体が検出された。一方、不活化ワクチンを接種したウマの血清中には抗NS1抗体が検出されなかった。したがって、抗NS1抗体を検出することによってワクチン接種馬群の中からウイルスに感染したウマを摘発できることが明らかとなった。

Immuno-polymerase chain reaction (immuno-PCR) を用いた抗原検出によるウマインフルエンザの高感度診断法を開発した。この方法によってA/Aichi/2/68 (H3N2) 株を実験感染させたマウスの鼻腔洗浄液および気管肺胞洗浄液中にNS1およびヘマグルチニン (HA) 抗原が検出された。その抗原検出感度はプラーク法によるウイルス分離、逆転写PCR (RT-PCR)法によるウイルスゲノム検出のそれを遙かに凌駕するものであった。そこで次に、A/equine/La Plata/1/93 (H3N8) 株を実験感染させたウマの鼻腔拭い液中のNS1およびHA抗原をimmuno-PCR法により検出した。その感度は両抗原遺伝子を検出するRT-PCR法の

$10^{4.0}$ および $10^{7.0}$ 倍であった。また、immuno-PCR法を用いれば、感染早期から、かつ長期間にわたり抗原が検出されることが明らかとなった。以上の成績から、ウマインフルエンザの診断にimmuno-PCRによる抗原検出法を適用すれば迅速かつ高感度にウイルス感染馬を摘発できることが明らかとなった。

A/equine/Miami/1/63 (H3N8) 株のHA分子上の少なくとも8つの異なるエピトープを認識しているモノクローン抗体パネルを確立した。このモノクローン抗体パネルを用いて、世界各地で異なる年に分離された計26株のウマH3インフルエンザウイルスHAの抗原性を詳細に比較解析し、次の結論を得た。

- 1) ウマのインフルエンザウイルスは年々抗原性が変化している。
- 2) モノクローン抗体パネルとの反応性からユーラシア型とアメリカ型の抗原変異株がウマの間で受け継がれている。
- 3) ウマのインフルエンザウイルスの抗原変異の程度はヒトのそれと比べて小さい。

我が国のウマインフルエンザワクチンに含まれる株と最近の流行株の免疫原性をマウスによる交差中和試験によって解析した。その結果、A/equine/Tokyo/2/71(H3N8)、A/equine/Kentucky/1/81 (H3N8) およびA/equine/Newmarket/1/77 (H7N7) を含む従来のワクチンはA/equine/Kentucky/1/92 (H3N8) 株の感染を中和する抗体を誘導しないことが判明した。一方、A/equine/Kentucky/1/92 (H3N8) 株は最近の流行株のみならず、従来のワクチン株に対しても高い免疫原性を示した。以上の成績に基づき、A/equine/Kentucky/1/92 (H3N8) 株あるいは相当するアメリカ型ウイルス株をワクチン株として導入することを提案した。これが受け入れられ、A/equine/Tokyo/2/71に代わってA/equine/La Plata/1/93がワクチンに導入された。

1994年と1996年にスウェーデンにおいてアメリカ型に属するウイルスによるウマインフルエンザが発生、流行した。この流行が起こったのはスウェーデンで使用されているワクチンにアメリカ型のウイルスが含まれていないためと指摘されている。日本の現行のウマインフルエンザワクチン株にはユーラシア型のH3N8ウイルスが含まれていない。したがって、ワクチン株の更新に際し、A/equine/Kentucky/1/81 (H3N8) 株に代えてユーラシア型のウイルス株を導入すべきと考える。

以上の成績より、インフルエンザウイルス感染馬を迅速に診断し、摘発するために抗NS1抗体の検出およびimmuno-PCR法によるウイルス抗原検出が有用であることが明らかとなった。また、ウマインフルエンザウイルスが年々抗原変異を起こしていることが明らかとなった。本研究の成績がウマインフルエンザの予防と制圧に資することを望むものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏  
副 査 教 授 小 沼 操  
副 査 教 授 高 島 郁 夫  
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on the Diagnosis and Prevention of Equine Influenza

(ウマインフルエンザの診断と予防に関する研究)

ウマの国際空輸移動に伴うインフルエンザの侵入と流行を予防するために、検疫の強化と適切なワクチン株の選定が重要課題となっている。本研究の目的は不活化ワクチン接種馬群からウイルス感染個体を摘発する血清診断法と病原検出迅速診断法を開発することならびにウマインフルエンザウイルスの抗原変異の実態を明らかにし、その成績に基づき、流行ウイルスの感染を効果的に防御し得るワクチン株を選定することである。

まず、Eq/MI/63 (H3N8) 株の NS 遺伝子をクローニングし、大腸菌で NS1 を発現させた。この組み換え NS1 はウマ、トリおよびヒトのウイルスのそれらと抗原性が共通であった。Eq/KY/81 (H3N8) または Eq/LP/93 (H3N8) 株を実験感染させたウマの血清に抗 NS1 抗体が検出されたが、不活化ワクチンを接種したウマの血清には検出されなかった。したがって、抗 NS1 抗体を検出することによってワクチン接種馬の中からウイルスに感染したウマを摘発できることが明らかとなった。

次に、ウイルス抗原検出によるウマインフルエンザの高感度迅速診断法として Immuno-PCR を確立した。本法を用いて Eq/LP/93 (H3N8) 株を実験感染させたウマの鼻腔拭い液中に NS1 および HA 抗原を検出した。その感度は各遺伝子を検出するための RT-PCR 法の  $10^{4.0}$  および  $10^{7.0}$  倍であった。さらに本法は、感染早期から長期間にわたり抗原を検出することが明らかとなった。以上の成績から、本法をウマインフルエンザの検疫診断に適用すれば迅速かつ高感度にウイルス感染馬を摘発できることが明らかとなった。

ウマインフルエンザウイルスの抗原変異の実態を明らかにするため、Eq/MI/63 株の HA 分子上の 8 つの異なるエピトープを認識するモノクローン抗体パネルを用い、世界各地で異なる年に分離された 26 株のウマ H3 ウイルス HA の抗原性を解析した。その結果、ウマの間でユーラシア型とアメリカ型のウイルスが年々抗原変異を起こしながら受け継がれていることが明らかとなった。

以上の成績は、インフルエンザウイルス感染馬を迅速に診断・摘発するために抗 NS1 抗体の検出および immuno-PCR によるウイルス抗原検出が有用であることならびにウマインフルエンザウイルスの抗原変異の実態を示すものである。本研究成果がウマインフルエンザの予防と制圧に資するとこ

ろが大であるので、審査員一同は尾崎弘一氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。