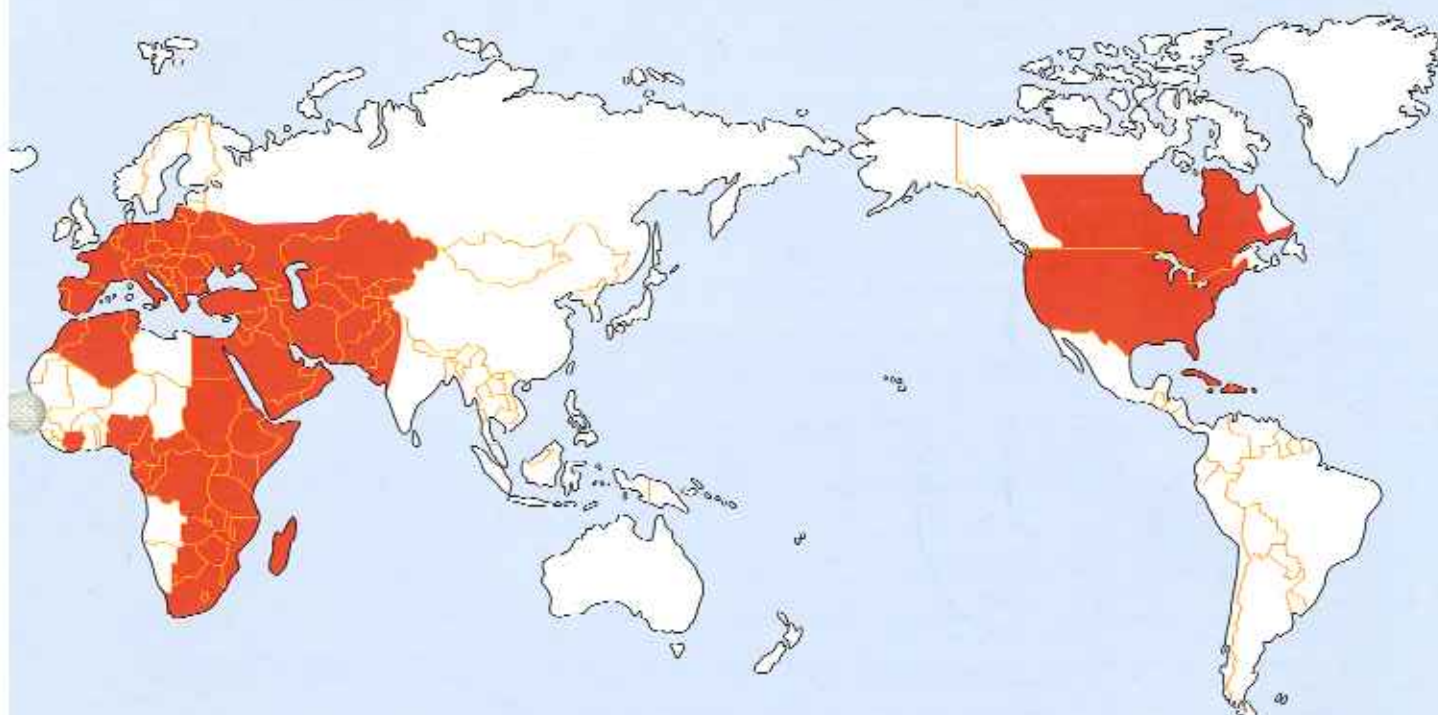


馬のウエストナイルウイルス感染症

West Nile Virus Infection in Horses

社団法人 全国家畜畜産物衛生指導協会



目 次

発刊にあたって.....	1
馬のウエストナイルウイルス感染症要約.....	2
馬のウエストナイルウイルス感染症について.....	3
I. 病原体.....	3
1. 形態と性状	
2. 生態	
II. 発生と分布.....	5
1. 発生の歴史	
2. 近年の主な発生	
3. 馬における主な発生	
4. 米国における発生状況	
III. 臨床と病理.....	9
1. 臨床症状	
2. 肉眼所見	
3. 組織学的所見	
IV. 診 断.....	10
1. 臨床診断および類症鑑別	
2. 病原学的診断	
3. 血清学的診断	
V. 検査手技.....	11
1. ウイルス分離	
2. RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出	
3. IgM捕捉ELISA法	
4. 中和試験	
VI. 予防と防疫.....	14
1. 予防	
2. ワクチンについて	
3. 防疫対応	
参考文献.....	15
おわりに.....	16

発刊にあたって

ウエストナイルウイルス（WNV）は、人にウエストナイル熱とよばれる急性の熱性疾患を、重篤な場合にはウエストナイル脳炎とよばれる髄膜脳炎を引き起こします。馬にも運動失調を主徴とする脳炎を引き起こす人獣共通感染症で、わが国では流行性脳炎として法定伝染病に指定されています。感染馬の多くは不顕性感染と考えられていますが、いったん脳炎を発症した場合の致死率は20-40%と高率です。

本ウイルスはアフリカ、中東、ヨーロッパの一部、インド等に広く分布しているウイルスで、イエカ属やヤブカ属の蚊を主要な媒介蚊として、蚊と鳥の間で感染環が成立しており、人や馬は終末宿主と考えられています。

近年、イスラエル、ルーマニア、ロシアなどで人の流行が認められ、馬でもモロッコ、イタリア、フランス、イスラエルなどで発生が報告されています。1999年8月にそれまでウイルスの存在が確認されていなかった米国のニューヨーク州でWNVによる脳炎の流行が人と馬で認められました。ウイルスの分布は拡大を続け、2002年には人で3873名の患者が、馬で14,714頭の発症が報告されています。

わが国にも感受性のある鳥類や蚊が存在しており、いったん侵入した場合には定着する危険性が指摘されています。また近年の馬の輸入頭数の増加や、競走馬の国際交流の機会の拡大により、輸入馬による本病の発症が危惧されています。農林水産省はウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルを作成しています。日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所では、米国農務省国立獣医研究所で行われている本病の遺伝子診断と血清学的診断技術の導入を行い、本病の侵入にそなえて診断体制の確立を行っています。

米国の状況を鑑みると、わが国にWNVが侵入する可能性は常にあり、防疫体制の確立とその充実をはかる必要があります。本小冊子が、馬のウエストナイルウイルス感染症の理解と防疫対応の一助になれば幸甚です。

社団法人 全国家畜産物衛生指導協会

馬のウエストナイルウイルス感染症要約

馬のウエストナイルウイルス感染症は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属するウエストナイルウイルス（WNV）の感染によって引き起こされる人獣共通感染症で、流行性脳炎として法定伝染病に指定されている。日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルスなどと抗原的に近縁である。

主にイエカ属とヤブカ属の蚊により媒介され、通常は蚊-鳥のサイクルで感染環が成立している。人や馬などの哺乳類は感染した蚊の吸血により感染し、終末宿主であると考えられている。カラスやアオカケスの感受性が高く、アメリカでは死亡したこれらの鳥からのウイルス検出率が高い。

WNVは1937年ウガンダで熱性疾患の人の血液から最初に分離された。アフリカ、中東、西アジア、東ヨーロッパや南ヨーロッパ、インド等に広く分布している。人では最近、イスラエル、ルーマニア、ロシア、チュニジア、コンゴ共和国などで発生報告がある。馬では、モロッコ、イタリア、フランス、イスラエルなど報告がある。

感染馬は通常不顕性に経過する。軽症では軽度の元気消失、運動失調を呈する。重症例では、痙攣、起立困難や起立不能、後軀の麻痺などの脳炎症状を呈する。病理学的には非化膿性脊髓脳炎が認められる。いったん脳炎を発症すると重篤になりやすく致死率は30～40

%程度である。死亡あるいは安楽死処置の率は高齢馬ほど高い傾向にある。馬の品種による感受性の差はない。

1999年の8月から10月にかけて米国ニューヨーク州で人と馬で初めてWNV感染症が認められた。分離ウイルスは中東でガチョウから分離されたウイルスと極めて類似しており、中東のウイルスが米国に侵入して流行を引き起こしたと考えられているが、侵入経路については不明である。その後、現在まで北米におけるウイルスの分布の拡大にともなって馬と人の発症例も増加している。カナダでも馬と人の発症例が確認されている。ウイルスは米国に完全に定着したと考えられている。

本病の診断は臨床診断、病原学的診断および血清学的診断によって行われる。病原学的診断としてウイルス分離とRT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出が用いられている。血清学的診断法としては、ペア血清を用いた中和試験とIgM捕捉ELISA法が有用である。IgM抗体はワクチン接種では検出されず、感染によって上昇する。

特異的な治療法はなく、症状に応じた対症療法を行う。蚊に刺されない措置を講じる、蚊の生息環境の浄化などの予防策が推奨される。2001年8月に、Fort Dodge社製の馬用不活化ワクチンが販売され、米国で広くワクチン接種が行われている。

馬のウエストナイルウイルス感染症について

I

病原体

1. 形態と性状

ウエストナイルウイルス（西ナイルウイルス、West Nile virus、WNV）は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する。ウイルス粒子の直径は約50nmで、エンベロープを有する小型・球形ウイルスで、約11kbの+鎖の1本鎖RNAを遺伝子として持つ。エンベロープにはウイルスの構造タンパク質であるエンベロープ（E）タンパクと膜（M）タンパクが存在している（図1）。Eタンパクはレセプター結合活性、pH依存性細胞融合活性を有し、ウイルスの赤血球凝集活性や中和などの血清反応に関与する。ヌクレオカプシドは直径約25nmでコア（C）タンパクから構成される。ウイルスの複製は細胞質内で行われる（図2）。ゲノムRNAからは1種類のポリタンパクが翻訳される。その後、ウイルス由来のプロテアーゼ（NS2B-NS3）と細胞のプロテアーゼにより開裂し、成熟タンパクとなる。非構造タンパクはNS1、NS2A、NS2B、NS3、

NS4A、NS4B、NS5の7種類存在し、直接あるいは間接的にウイルスの複製に関与している。NS5がRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有している。



図1. フラビウイルスの構造模式図
(Roehrigら (2002) を改変)



図2. Vero細胞の細胞質内で増殖したWNV
(国立感染症研究所 高崎智彦博士提供)

フラビウイルス属にはおよそ70種類のウイルスが知られている。抗原性の類似からWNVは、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、クンジンウイルスなどとともに日本脳炎ウイルス血清群に分類される。クンジンウイルス (Kunjin virus) は、WNVの亜種と考えられており、主にオーストラリアに分布し馬に脳炎を起こすことがある。感染した人の症状は比較的軽度である。

WNVは、赤血球凝集阻止反応などによる反応性の差やモノクローナル抗体で検出されるウイルス株間の抗原性の相違が認められる。遺伝子の系統樹解析では、Lineage I とLineage II に大別される (図3)。Lineage II にはアフリカ西部、中央部、東部で分離されたウイルスが含まれる。Lineage I には主にアフリカ北部、中央部、西部、ヨーロッパ、中東、インドなどで分離されたウイルスとクンジンウイルスが含まれる。

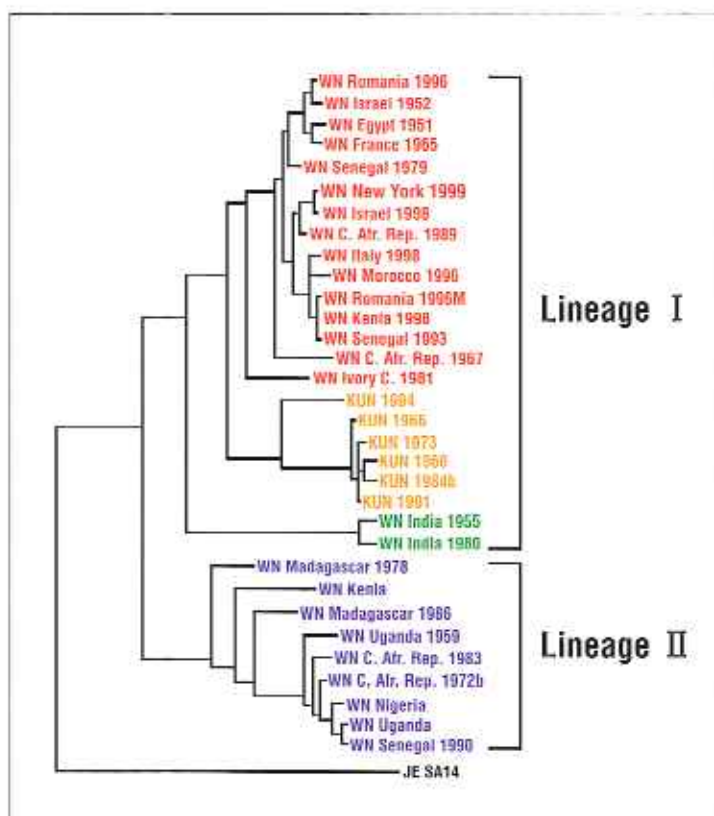


図3. WNVのEタンパク遺伝子の系統樹解析 (Lanciottiら (1999) を改変)

2. 生態

WNVは自然界では鳥-蚊のサイクルで感染環が成立している (図4)。主にイエカ属 (*Culex*)、ヤブカ属 (*Aedes*) の蚊が媒介する。エジプトや中央アフリカ共和国などではWNVがダニから分離された報告があるが、伝播における重要性は不明な点が多い。アフリカでは *Cx. univittatus*, *Cx. antennatus*, *Cx. pipiens* などが主要な媒介蚊である。アメリカでは *Cx. pipiens* からのウイルス検出率をもっとも高いが、その他 *Cx. salinarius*, *Cx. restuans*, *Ae. vexans* など8属50種類近い蚊からウイルスが分離されている。鳥類ではカラス、スズメ、ハトなどの抗体保有率が高いことが報告されている。コウノトリなどの渡り鳥がウイルスの伝播に関与していると考えられている。アメリカでは100種類以上の鳥類で感染が報告されているが、カラスやアオカケス (blue jay) の感受性が特に高く、多数の死亡例が報告されている。人や馬などの哺乳類は感染蚊の吸血により感染するが、終末宿主であると考えられている。

その他の哺乳動物としてはチンパンジー、キツネザル、アカゲザル、イヌ、ラクダ、水牛、ウシ、ヤギ、コウモリ、リスなどで感染が認められている。両棲類のカエルやハ虫類のワニなどの感染も報告されている。

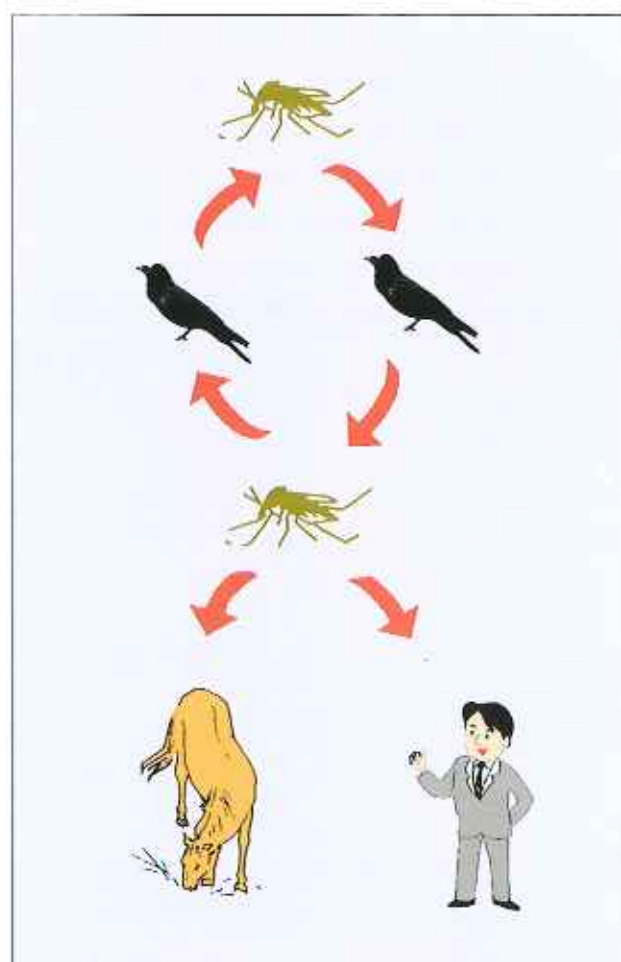


図4. WNVの感染環

1. 発生の歴史

WNVは1937年ウガンダのWest Nile Provinceで熱性疾患の女性の血液から最初に分離された。1950年代前半にエジプトにおいて、1) 人、哺乳動物、鳥類の血清学的調査、2) 自然感染宿主とベクターからのウイルス分離、3) 人、馬、鳥類、節足動物ベクターの感染実験、4) 生態学的調査などが行われた。エジプトのナイル川流域の血清疫学調査では抗体保有率は60%以上と高く、高齢者ほど高い傾向にあった。鳥類の調査では、カラス(65%)とスズメ(42%)に特に高率に中和抗体が認められた。これらの研究の結果から、WNVの感染環は鳥類と蚊の間で成立しており、人や馬は感染蚊の吸血によって感染して時に発症するが、いわゆる終末宿主であることが示された。

人の最も大きな流行は1974年に南アフリカ共和国で報告された。大雨の後、3-4月をピークとして1月から6月にかけて発生が認められた。患者数は約3,000名、血清学的調査では感染者は約18,000名と報告されている。アフリカではセネガル、アルジェリア、コートジボアール、マダガスカル、エチオピア、ナイジェリア、ウガンダ、中央アフリカ共和国、ケニアな

どの国でもウイルスが分離されている。

WNVが原因であることが明らかな、最初の人での流行はイスラエルで1951年に報告されている。123名の患者が認められたが、死亡者は報告されていない。イスラエルではその後1952年および1957年にも流行が報告されている。その他の国では、イラン、インド、パキスタン、スペイン、ポルトガル、フランス、ギリシャ、ハンガリー、ルーマニア、チェコ共和国、オーストリア、ポーランド、ロシアなどでウイルス分離あるいは血清学的調査によりウイルスの存在が報告されている(図5)。

2. 近年の主な発生

1980年代におけるWNVの発生報告は多くない。しかし1990年代に入り、アルジェリア(1994年)、チェコ共和国(1997年)、チェンジア(1997年)、コンゴ共和国(1998年)、ルーマニア(1996年)、ロシア(1999年)、イスラエル(2000年)などで流行が報告されている。イスラエルでは2000年に417名のWNV感染症の患者が報告されており、35名(8.4%)が死亡した。またイスラエルでは1998年以降、家禽のガチョウで

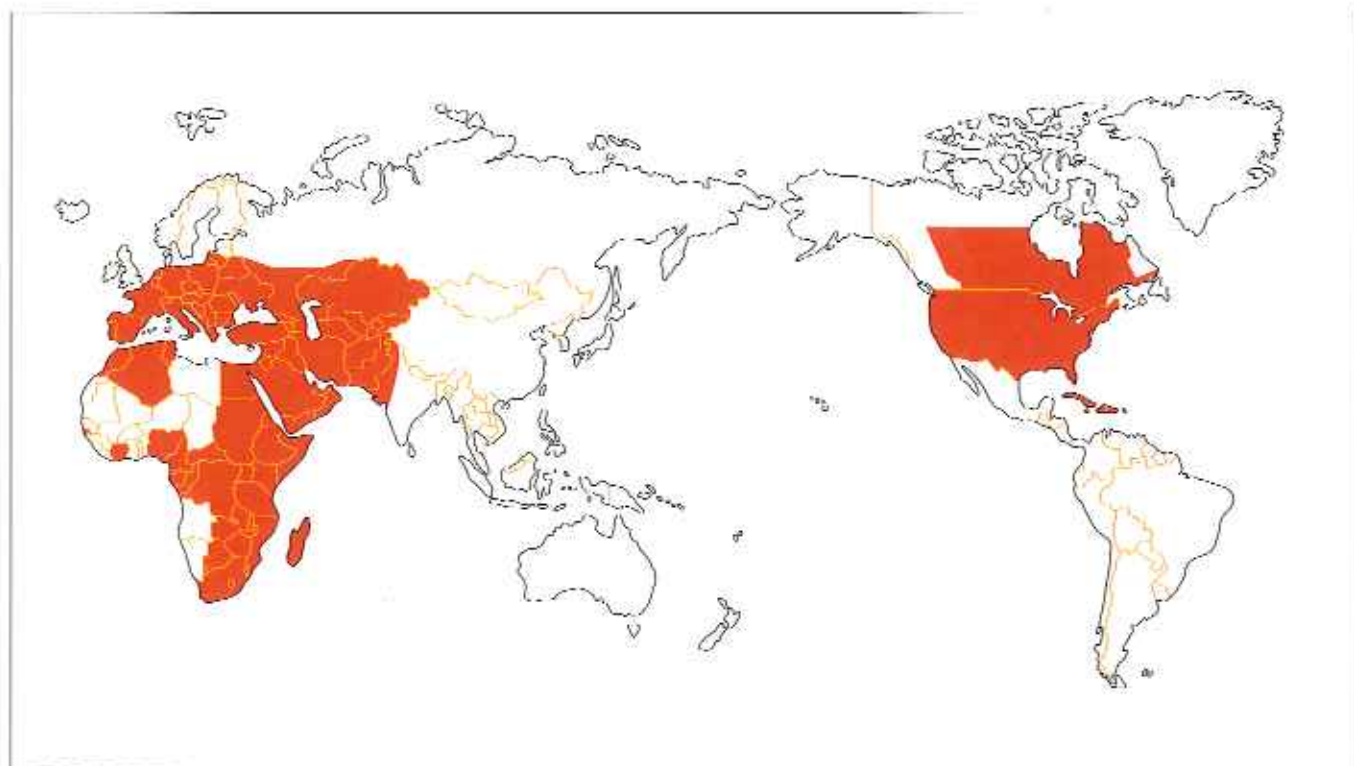


図5. WNVの分布

WNV感染症が発生している。ルーマニアではBucharestを中心として1996年7月から10月にかけて神経症状を呈した835名中、509名が検査されそのうち393名（77%）が血清学的にWNV感染と診断された。死亡者は17名ですべて50歳以上であった。1999年にはロシア南西部のVolgogradで急性無菌性髄膜炎と診断された826名の患者のうち、318名中183名（58%）が血清学的にWNV感染と診断され、感染患者数は全体では480名と推定された。

3. 馬における主な発生

1950年代のエジプトでの研究で馬がWNVに自然感染することが明らかにされた。1959年の調査では馬の抗体保有率は14%（Alexandria）から89%（Qena）であり、発症馬からウイルスが分離された。フランスでは1962年に南東部の地中海に面するBouches-du-Rhône県のCamargueとその北部の地域で約50頭の馬の発症が報告された。その他に野生馬にも発症例が認められたが正確な頭数は不明である。致死率は25-30%であった。その後、1963年と1964年の血清学的調査で同地域の馬37頭中6頭に抗体が認められた。1965年

には3頭の神経症状を示した馬で感染が確認され1頭が死亡した。2000年にはCamargueの西の地域で76頭が発症し21頭が死亡した。この時に行われた感染馬の厩舎から半径10km以内の5107頭の馬属の血清学的調査ではIgG-ELISA抗体陽性が432頭（8.5%）で、そのうちの182頭（42.1%）がIgM捕捉ELISAでも陽性であった。モロッコでは1996年に94頭が発症し、そのうち42頭が死亡したと報告されている。イタリアのTuscany地方では1998年に14頭が発症し、そのうち2頭が死亡し1頭が安楽死処置をされた。

4. 米国における発生状況

1999年8月、ニューヨーク州において突如、人と馬でWNV感染症が発生した。発生は拡大し、2002年末には米国本土のほとんどの州とカナダの一部の州、カリブ海諸国にも分布が拡大した（図6）。以下に発生の拡大の状況について記す。

1. 1999年

1999年8月にニューヨーク市で人の脳炎が発生した。当初はセントルイス脳炎であると診断された。その後脳炎患者数が増加した。死亡したカラスの脳からウイ

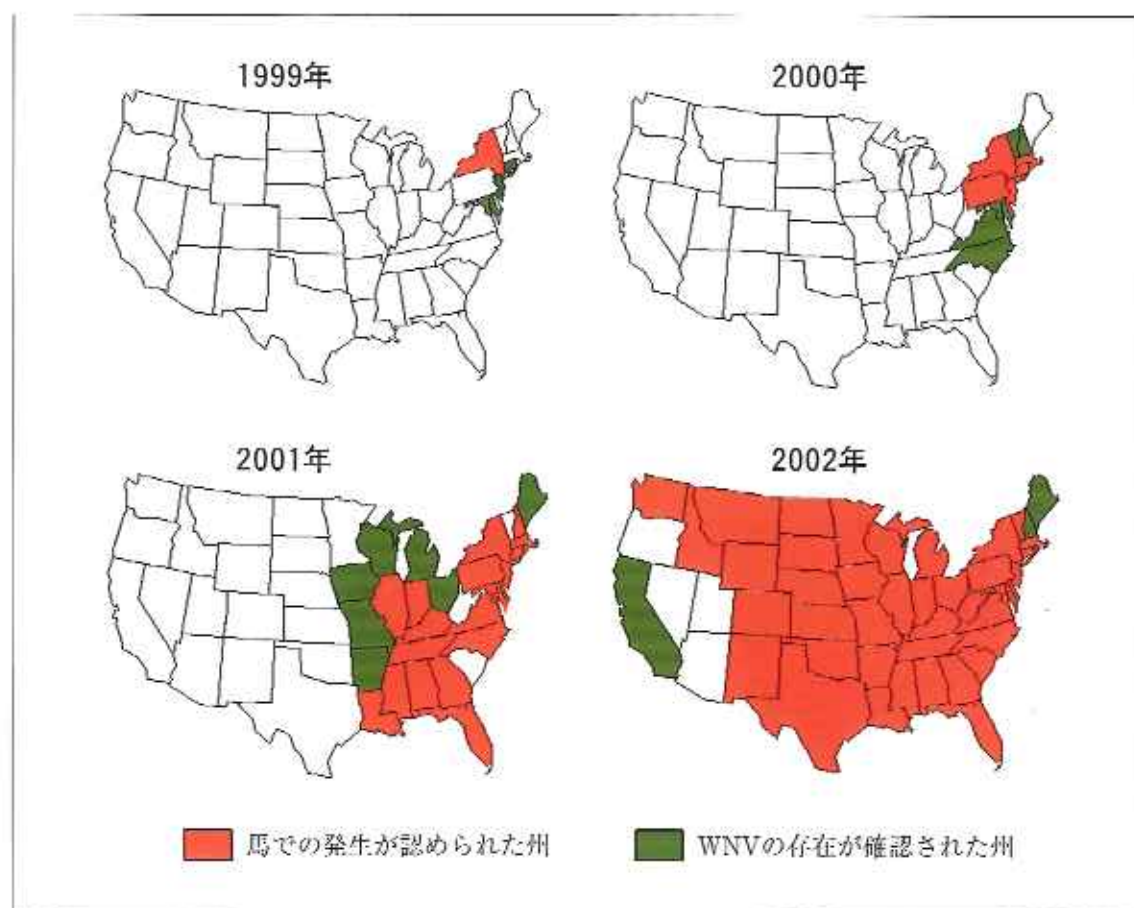


図6. 米国におけるWNVの浸潤状況

ルスが分離され、WNVであると確認されたのは9月末であった。米国では初めてのWNVの発生である。ニューヨーク州のWNV感染症の患者数は、8月から9月にかけて62名でありそのうちカナダからの旅行者1名を含む7名が死亡した。ニューヨークでは6月中旬以降からカラスの死亡例が多数認められ、またブロンクス動物園ではフラミンゴなどの鳥類に脳炎による死亡が認められた。分離ウイルスの遺伝子配列は1998年にイスラエルのガチョウから分離されたウイルスとほとんど同一であり、中東の流行ウイルスが何らかの原因でニューヨークに持ち込まれたと推測されている。感染した鳥、人あるいは蚊が航空機で運ばれたとする説などがあるが、未だに侵入ルートは不明である。

馬ではロングアイランドで25頭(サフォーク郡22頭、ナッソー郡3頭)の発症例が認められ、そのうち9頭(36%)が死亡ないし安楽死処置をされた。発症馬の平均年齢は15.5歳(n=21)で、年齢の範囲は3歳から30歳であった。初発は8月25日、最終発生は10月18日であった(図7)。死亡鳥類の調査では、カラスを主としてコネチカット、メリーランド、ニュージャージーおよびニューヨーク州の4州で194羽の陽性例が確認された。

2. 2000年

2000年1月から2月にかけてニューヨーク州で捕獲された蚊からウイルス遺伝子が検出され、また2月に死亡したタカの脳からウイルスが分離されたことから、ウイルスの越冬が確認された。最終的に報告された人のWNV感染症の発生は3州(コネチカット、ニュージャージーおよびニューヨーク州)で21名、そのうち2名が死亡した。鳥類はカラスを主体として4,323羽の陽性例が12州とコロンビア特別区で報告された。

馬のWNV感染症の発生は、8月17日(ニューヨーク州)から10月30日(デラウェア州)にかけて報告された。最終的に7州で60頭の発症が認められ、そのうち23頭(38%)が死亡ないし安楽死処置をされた。発症馬の年齢の平均は14歳で年齢の範囲は3ヶ月から38歳であった。

3. 2001年

人では10州で66名が発症し9名が死亡した。鳥類では27州とコロンビア特別区で7,333羽の陽性例が認められたが、およそ70%がカラスであった。カナダのオンタリオ州でも8月に死亡したカラスからWNVが初めて検出され、最終的に128羽の死亡鳥類からウイルスが検出された。

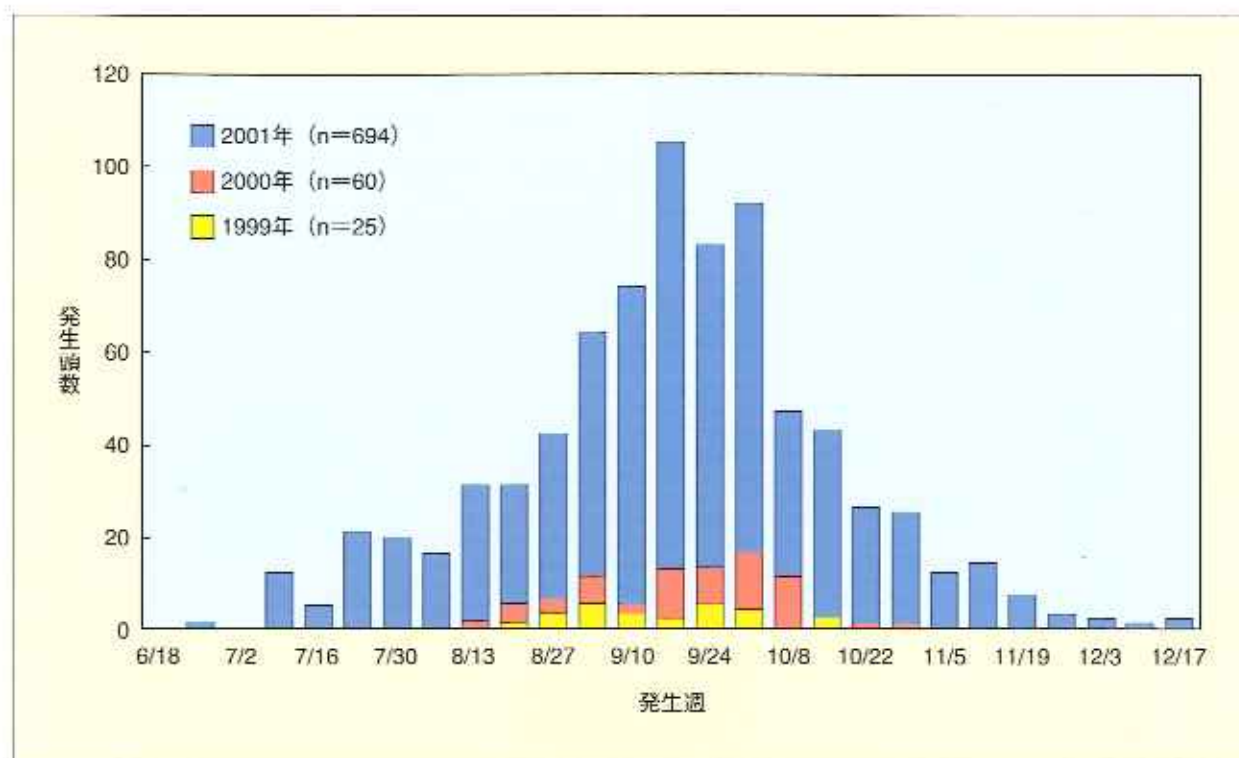


図7. 米国におけるWNV感染症罹患馬の発生状況 (1999年-2001年)

馬では、20州で738頭の臨床例が報告された。そのうち651頭が米国農務省（USDA）で診断が行われ、640頭がWNV感染症と確定診断がなされた。転帰が明らかな470頭中156頭（33%）が死亡ないし安楽死処置をされた。発症馬の平均年齢は11.6歳、死亡馬（安楽死を含む）の平均年齢は13.9歳であった。発症馬の致死率は高齢馬ほど高い傾向にある（図8）。初発は6月、最終発生は12月でいずれもフロリダ州であった。フロリダ州の発症頭数は492頭で、全発症馬の70%近くを占めた。

4. 2002年

1月にフロリダ州で最初の馬のWNV感染症の発生が認められた。その後、発生州・発生頭数とも、急激

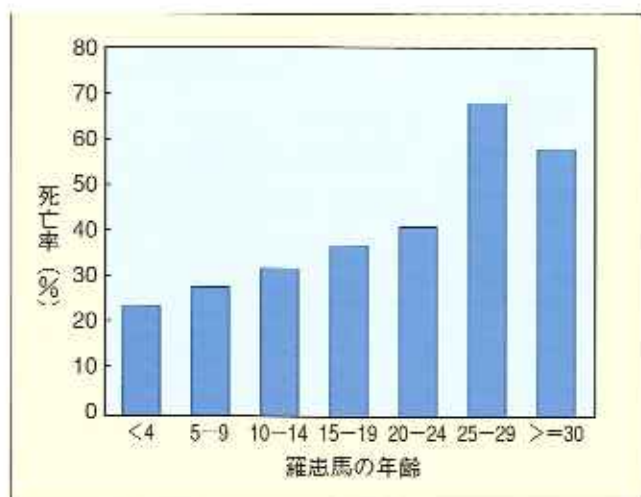


図8. 米国におけるWNV感染症罹患馬の年齢別致死率（2001年、n=455、安楽死処置馬を含む）

に増加した（図9）。12月31日時点での発生は40州で14,717頭と報告されている。2002年の州別の発症頭数は以下の通りである。

アラバマ88頭、アーカンソー148頭、コロラド378頭、コネチカット4頭、デラウェア13頭、フロリダ494頭、ジョージア149頭、アイダホ1頭、イリノイ1,107頭、インディアナ703頭、アイオワ1,039頭、カンザス793頭、ケンタッキー513頭、ルイジアナ362頭、メリーランド17頭、マサチューセッツ2頭、ミシガン329頭、ミネソタ992頭、ミシシッピ269頭、ミズーリ914頭、モンタナ134頭、ネブラスカ1,100頭、ニュージャージー47頭、ニューメキシコ61頭、ニューヨーク36頭、ノースカロライナ29頭、ノースダコタ569頭、オハイオ644頭、オクラホマ954頭、ペンシルニア97頭、サウスカロライナ14頭、サウスダコタ672頭、テネシー141頭、テキサス1,597頭、バーモント5頭、バージニア45頭、ワシントン2頭、ウェストバージニア3頭、ウィスコンシン156頭およびワイオミング州96頭。

カナダでもマニトバ州とオンタリオ州でWNV感染馬が認められている。

人では39州とコロンビア特別区で3,873名（うち246名死亡）の患者が報告されている。また輸血や臓器移植に伴う感染例も少数例であるが報告されている。カナダではアルバータ州、ケベック州およびオンタリオ州で患者が報告されている。

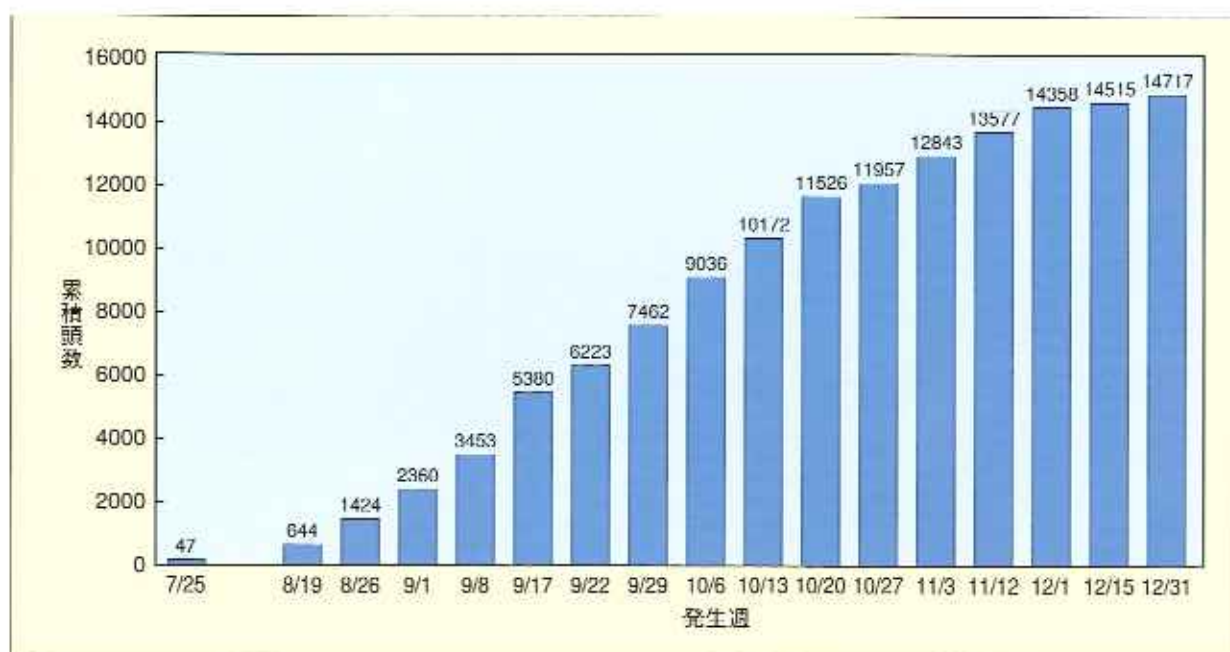


図9. 米国におけるWNV感染症罹患馬の累積発生頭数（2002年）

1. 臨床症状

馬における自然感染時の発症率は不明であるが、多くは不顕性感染であると考えられている。馬を用いた実験感染はエジプト、フランス、米国で報告されている。接種ウイルス株、接種ルートや接種量などが異なるために同一には論じられないが、脳炎症状を呈する例は少なく、多くは無症状のまま経過する。米国疾病対策センター（CDC）が感染蚊の吸血により行った実験感染では、脳炎症状を呈したのは12頭中1頭のみであった。ウイルス血症時におけるウイルス量は少なく持続期間も短いために、野外での蚊によるウイルスの伝播には馬はほとんど関与しないと考えられている。

最も一般的に観察される臨床症状は後肢の対称性あるいは非対称性の運動失調ないし不全麻痺である。米国における報告（2000年）では85%の馬に運動失調が認められた。その他の症状としては、後肢の虚脱（48%）、横臥、起立困難またはその両方（45%）、筋肉の痙攣（40%）、発熱（23%）、口唇麻痺あるいは下垂（18%）、顔面あるいは鼻口部の痙攣（13%）、歯ざしり（7%）、盲目（5%）などが報告されている（図10、図11、図12）。症状の持続期間は2日から2週間程度であるが、完全に回復するまでに1ヶ月以上かかる症例も認められる。脳炎を発症した場合の致死率（安楽死を含む）は比較的高くおよそ20-40%であり高齢馬ほど高い傾向にある。発症率や症状に、馬の品種による相違は認められない。



図10. WNV感染馬の臨床症状（歩様異常）
（ニューヨーク州農務局 Susan C. Trock博士提供）

2. 肉眼所見

脳炎症状を呈した馬でもほとんど肉眼病変が認められない場合がある。モロッコでは肺に浮腫および出血が認められた症例が報告されている。通常、肉眼所見は中枢神経系に局限する。硬膜の肥厚や癒着、点状あるいはび散性の出血を伴う髄膜下の浮腫が認められることがある。

3. 組織学的所見

中枢神経系に認められる所見は、他のアルボウイルス感染やヘルペスウイルス脳脊髄炎で認められる所見と共通する。散在性の非化膿性脊髄脳炎で、単核球の血管性細胞浸潤が認められる。多巣性の壊死巣が認められることがある。イタリアの症例では、主要な病変は脳幹下部と脊髄胸部と腰部の前角に認められている。



図11. WNV感染馬臨床症状（起立不能）
（ニューヨーク州農務局 Susan C. Trock博士提供）



図12. WNV感染馬臨床症状（後肢の虚弱による起立困難）
（ニューヨーク州農務局 Susan C. Trock博士提供）

1. 臨床診断および類症鑑別

臨床的に神経症状を示す疾患は多数知られており、症状のみからは本病の診断は困難である。類症鑑別が必要な疾患としては、日本脳炎、神経型のウマヘルペスウイルス1型感染症、ボルナ病、馬原虫性脊髄脳炎、脳脊髄糸状虫症、破傷風、各種細菌による脳脊髄炎、腫瘍、海外病としては東部馬脳炎、西部馬脳炎、ヴェネズエラ馬脳炎、狂犬病などがあげられる。また外傷性の傷害でも類似の症状を呈する場合がある。組織病変でも、狂犬病以外のウイルス性脳炎では類似の所見を示すために、臨床症状と組織所見のみでは確定診断は困難である。

2. 病原学的診断

病原学的診断としては、ウイルス分離、組織中のウイルス抗原の検出、RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出などが行われる（図13、図14）。ただしウイルス血症の認められる期間は感染後数日と短いために、野外の発症馬の血液中からのウイルス分離あるいは遺伝子検出は困難な場合がある。

3. 血清学的診断

血清学的診断法として、赤血球凝集阻止（IT）試験、補体結合（CF）試験、ウイルス中和試験、IgM捕捉ELISA法などが用いられている。このうちIT試験とCF試験はウイルス特異性が低く、ウイルス特異的抗体の検出には適さない。中和試験およびIgM捕捉ELISA法は比較的ウイルス特異性が高い。中和試験はワクチン抗体と感染抗体の両者を検出する。IgM-ELISA法は感染初期抗体の検出に有効であり、ワクチン接種ではIgM-ELISA抗体は上昇しない。したがってIgM抗体の存在は感染を強く示唆するが、人のIgM抗体の持続を調査した成績によると500日以上経過しても陽性と診断される例が報告されている。血清学的診断では可能な限りペア血清を用いて抗体価の変動を確認することが重要である。日本には日本脳炎ウイルスが存在しており、すべての競走馬は日本脳炎ウイルスの不活化ワクチンを接種されている。WNVは日本脳炎ウイルスと血清学的に交叉する。したがって、日本脳炎ウイルスに対する抗体価も同時に測定して成績を解釈する必要がある。

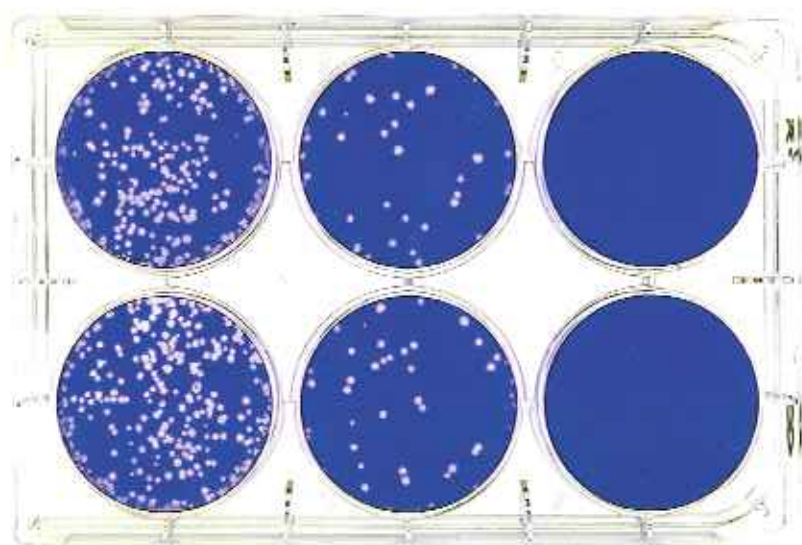


図13. Vero細胞でのWNVのブラック



図14. RT-PCR法によるWNV遺伝子の検出

1. ウイルス分離

1) 分離材料

急性期の発症馬の血漿、血清、脊髄液、剖検時に採材される中枢神経系組織を用いる。脳組織では、抗生物質と2～5%の牛胎仔血清を加えた細胞培養液で10%乳剤を作製し、10,000rpm、15分間冷却遠心した上清をフィルターでろ過し、分離用の接種材料とする。

2) 乳のみマウスの脳内接種法

生後2～4日目の乳のみマウスの脳内に2段針を用いて25μl/1匹の分離用材料を接種する。1サンプル当たり8～10匹（1腹）の乳のみマウスを用いる。接種後10日間程度観察を続ける。発症したマウスは放血後、脳を回収する。脳の一部は抗原抽出に用い、III試験などを用いた同定を行う。また脳乳剤を次に述べる感受性のある培養細胞に接種し、細胞変性効果(CPE)やブラックの有無を調べる。あるいは培養上清中のウイルス遺伝子をRT-PCR法で検出する。

3) 培養細胞による分離

Vero, BHK-21細胞等、ウイルスに対する感受性のある哺乳動物由来細胞を用いる。蚊由来のC6/36細胞は乳のみマウスの脳内接種と同程度の感度があるといわれている。これらの細胞に分離材料を接種し、CPEの有無を、通常1週間程度観察を続ける。初代の培養では明らかなCPEが認められないことがあり、継代培養が必要な場合がある。感染細胞を特異抗体による蛍光抗体(FA)法で染色し、ウイルス抗原を検出する、あるいは培養上清を用いてRT-PCR法によりウイルス遺伝子を検出することが可能である。

2. RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出

USDAの国立獣医研究所(NVSL)で行われている方法の概略を記す。E領域の2組のプライマーを用いてnested RT-PCR法を行う。

プライマー

第1ステップ	
WN1401:	ACC AAC TAC TGT GGA GTC
WN1845:	TTC CAT CTT CAC TCT ACA CT

第2ステップ (nested)

WN1485:	GCC TTC ATA CAC ACT AAA G
WN1732:	CCA ATG CTA TCA CAG ACT

各ステップのプライマーセットはそれぞれ25pmol/μl濃度に調整し、等量混合して分注保存する。

材料として、血液を用いる場合は採血にヘパリンを用いず、EDTAを利用する。市販のRNA抽出試薬やキット、RT-PCR反応キットを用いる場合にはマニュアルに記載されている手順に従う。使用する酵素の種類によってはRT-PCR反応の至適条件を予め検討する必要がある場合がある。

- 材料からRNAを抽出する。
- 以下のように調整した反応液を、1サンプル当たり48μlずつPCR用反応チューブに分注する。

RNase-free 蒸留水	31.5 μl
10 x buffer (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl)	5.0 μl
MgCl ₂ (25mM)	4.0 μl
dNTP mix (10mM)	4.0 μl
M-MLV Reverse transcriptase (200 u/μl)	0.125 μl
RNase inhibitor (10 u/μl)	0.125 μl
AmpliTaq Gold™ (5 u/μl)	0.25 μl
Primer pool WN1401/WN1845	3 μl

- 反応液を分注した各チューブに抽出したRNAを2μl加える（陽性対照にはウイルスRNAを、陰性対照にはRNase-free蒸留水を加える）。
- 以下の反応条件でRT-PCR反応を行う。

45℃	45分	35サイクル
95℃	11分	
95℃	30秒	
55℃	45秒	
72℃	60秒	
72℃	5分	
4℃	forever	

- nested PCR反応用に以下のように調整した反応液を、1サンプル当たり49μlずつPCR用反応チューブに分注する。

ブに分注する。

RNase-free 蒸留水	32.75 μ l
10 x buffer (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl)	5.0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	4.0 μ l
dNTP mix (10mM)	4.0 μ l
AmpliTaQ Gold™ (5 u/ μ l)	0.25 μ l
Primer pool WN1485/WN1732	3 μ l

- f. RT-PCR反応が終了したチューブから1 μ l 取りだし、各チューブに1 μ l 加える。
g. 以下の反応条件でnested PCR反応を行う。

95℃	11分	35サイクル
95℃	30秒	
55℃	45秒	
72℃	60秒	
72℃	5分	
4℃	forever	

- h. 反応産物をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりWNV特異的増幅DNAのバンドを検出する。

3. IgM捕捉ELISA法

NVSLが行っているIgM捕捉ELISA法の術式の概略を記す。ただし術式の一部を改変している。使用する抗体や抗原の力価は予めBox titrationで検定し、使用濃度を検討しておく必要がある。この方法はウイルス抗原を抗フラビウイルスモノクローナル抗体で検出する。したがってモノクローナル抗体が結合するウイルスであれば、異なるウイルス種であっても、同一の方法で、抗原として使用するウイルスに対するIgM抗体を検出することができる。

- a. ELISA用96穴プレートに、coating buffer (炭酸/重炭酸緩衝液、pH9.6) で希釈した抗馬IgM抗体 (アフィニティ・精製した市販品) を100 μ lずつ分注する。蒸発を防止するためにプレートにシールをし (以下、インキュベート時には同じ作業を行う)、4℃で一晩静置する。
b. プレートを200-300 μ l の洗浄液 (0.05% Tween 20加PBS) で2回洗浄する。
c. プレートに300 μ l のblocking buffer (5%脱脂粉乳を含む洗浄液) を分注し、室温で1時間静

置する。

- d. 被験血清を希釈液 (洗浄液と同じ) で400倍に希釈する。脳脊髄液の場合は2倍に希釈する。陽性血清および陰性血清も400倍に希釈する。
e. インキュベートの終了したプレートを3回洗浄する。
f. 希釈済み被験血清および対照血清を右ページの図のように50 μ l ずつ分注する。1枚のプレートで20検体が検査できる。各検体についてウイルス抗原 (+) および陰性抗原 () 反応用それぞれ2穴ずつ用意する。陽性および陰性対照血清はそれぞれの抗原に対して3穴ずつ用意する。A1、A2、B1およびB2は希釈液を分注する。
g. プレートを37℃で75分静置する。
h. ウイルス抗原および陰性抗原を希釈液で希釈する。
・ウイルス抗原はWNV感染細胞の培養上清を β -プロピオラクトンで不活化処理を行って作製する。陰性抗原は、非感染細胞の培養清を同様に処理して作製する。
i. インキュベートの終了したプレートを3回洗浄する。
j. ウイルス抗原 (+) および陰性抗原 (-) を右ページの図のように50 μ l ずつ分注する。A1とA2には希釈液を分注する。
k. プレートを4℃で一晩静置して抗原を反応させる。
l. インキュベートの終了したプレートを3回洗浄する。
m. ペルオキダーゼ標識抗ウイルス抗体を50 μ l ずつ分注する。
n. プレートを37℃で60分静置する。
o. インキュベートの終了したプレートを5回洗浄する。
p. 発色基質 (ABTS) を50 μ l ずつ分注し、暗所で室温30分反応させる。
q. 吸光度計で、405nmの波長で吸光度を測定する。
・用いる基質の種類によっては発色反応後に、停止液を加える必要がある。また測定波長は、用いる基質によって異なる。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B		1—		2—		3—		4—		5—	
B	B—	B+	1+		2+		3+		4+		5+	
C	6—		7—		8—		9—		10—		11—	
D	6+		7+		8+		9+		10+		11+	
E	12—		13—		14—		15—		16—		17—	
F	12+		13+		14+		15+		16+		17+	
G	18—		19—		20—		陽性血清—			陰性血清—		
H	18+		19+		20+		陽性血清+			陰性血清+		

- r. 被験血清のウイルス抗原に対する吸光度値と陰性抗原に対する吸光度値の比 (P/N比) が2を越えている場合を陽性と判定する。判定結果は $<1:400$ (陰性)、 $=1:400$ または $>1:400$ (陽性) と記載する。 $=1:400$ (P/N比が2-2.2程度) の検体は反応の再現性を確認する。

4. 中和試験

NVSLが行っているブラック減少法による中和試験の術式の概略を記す。ただし術式の一部を改変している。

- 6穴プレートに単層培養したVero76細胞を準備する。
- 被験血清を2%牛胎仔血清 (FCS) を含むイーグルMEM培地 (希釈液) で5倍希釈し、56℃、30分非働化した後に、希釈液で2倍階段希釈を行う。
- 力価を200PFU/100 μ l になるようにウイルス液を10%モルモット補体を含む希釈液で調整し、氷中に置く。
- 被験血清の各希釈液200 μ l に等量の調整済みウイルス液を加え、よく混和後、恒温水槽で37℃、90分中和反応させる。ウイルス対照は、希釈液にウイルス液を加え、同様に恒温水槽で37℃、90分置く。中和反応後の試験管は直ちに氷中に置く。
- 6穴プレートの培養液をアスピレーターで吸引除

去する。

- 中和反応済みの被験血清の各希釈を100 μ l /穴で2穴ずつ接種する。ウイルス対照にはプレート1枚 (6穴) を用いる。
- プレートを37℃の5%炭酸ガス培養器内に90分静置し、ウイルスを細胞に吸着させる。接種直後およびその後は15分ごとにプレートを軽く揺り動かし、細胞全面に接種液が広がるようにする。
- 1%メチルセルロースを含む2%FCS加MEM培地を3mlずつ各穴に加える。
- プレートを37℃の5%炭酸ガス培養器内で4日ないし5日間培養する。
- 培養終了後、メチルセルロース培地を除去し、10%ホルマリン加0.1%クリスタルバイオレット液で染色する。
- 室温で1時間以上染色後、流水で染色液を洗い流す。
- 被験血清の各希釈におけるブラック数を数え、ウイルス対照のブラック数の10%以下のブラック数を示した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

注) 日本では通常50%ブラック減少法を用いているが、NVSLでは、90%ブラック減少法を採用している。この場合抗体価は50%ブラック減少法に比べて低めに算出される。

1. 予防

予防法は一言で言うと「蚊に刺されないこと」である。そのための対策としては皮膚の露出を避ける、厩舎の網戸を閉めておく、殺虫剤の使用、吸血昆虫用捕獲用のドライアイストラップの使用などがあげられる。蚊の駆除や蚊の発生する水たまりや生息環境の清浄化などの飼養環境の衛生対策も重要である。本病に特異的な治療法はなく、対症療法を行う。

2. ワクチンについて

米国ではFort Dodge社製の馬用の不活化ワクチンが2001年8月から米国で用いられている（図15）。ワクチンに使用されているウイルス株は、1999年にニューヨークの馬から分離された株である。1ドーズを3～6週間隔で2回、頸部筋肉内に接種する。以後は補強接種として、1年に1回1ドーズを頸部筋肉内に接種する。本ワクチンの接種により中和抗体の上昇が認められるが、IgM抗体は検出されない。Fort Dodge社の報告によると、32頭の妊娠馬を含む600頭の馬を使用した安全性試験では異常は認められていない。また本ワクチンを2回接種後、12ヶ月後にワクチン接種群と非接種対照群にWNVを攻撃接種したところ、非接種対照群では11頭中9頭（81.8%）にウイルス血症が認められたが、ワクチン接種群では19頭中1頭（5.3%）

のみが一過性のウイルス血症を示したのみであった。ワクチン接種群および非接種群ともにWNV攻撃後に臨床症状は示さなかった。

3. 防疫対応

農林水産省生産局畜産部衛生課により「ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアル」が作成されている。本マニュアルは、わが国における本病のサーベイランスおよび発生時における防疫措置を適切に実施することを目的としている。本病は法定伝染病であり、発症が疑われる症状の馬を発見した獣医師や飼養者は、家畜保健衛生所に通報しなければならない。本病の患畜あるいは疑似患畜は、隔離され21日間経過観察を行い、臨床上の異常の無いこととおよび本ウイルスが血液中に存在しないことが確認できれば通常の飼育に戻すことができる。

本病の発生国からの馬の輸入の場合には、過去60日間、飼育施設の周辺半径50km地域に本病の発生が無く、また飼育施設に過去6ヶ月間本病の発生が無いことの証明が必要である。周辺地域で発生がある場合には、飼育施設に過去6ヶ月間、本病の発生がないという証明と、2回のワクチン接種が必要である。また輸出国では船積み前7日間、到着後は動物検疫所で10日間の輸入検査を受ける必要がある。



図15. WNVの不活化ワクチン（Fort Dodge社）

参考文献

総説と馬のWNV感染症に関する最近の文献を主に掲載した。

1. Autorino, G. L. et al. (2002) West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1372-1378.
2. Briese, T. et al. (1999) Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet* 354: 1261-1262.
3. Brinton, M. A. (2002) The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the Western Hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 371-402.
4. Bunning, M. L. et al. (2002) Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 380-386.
5. Campbell, G. L. et al. (2002) West Nile virus. *Lancet Infect. Dis.* 2: 519-529.
6. Cantile, C. et al. (2000) Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.* 32: 31-35.
7. Cantile, C. et al. (2001) Pathological and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infections in horses. *Vet. Pathol.* 38: 414-421.
8. Durand, B. et al. (2002) West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 777-782.
9. Hubálek, Z. and Halouzka, J. (1999) West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643-650.
10. Jia, X. Y. et al. (1999) Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet* 354: 1971-1972.
11. Lanciotti, R. S. et al. (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286: 2333-2337.
12. Malkinson, M. and Banet, C. (2002) The role of birds in ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 267: 309-322.
13. McLean, R. G. et al. (2002) West Nile virus in livestock and wildlife. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 267: 271-288.
14. Murgue, B. et al. (2001) West Nile outbreak in horses in southern France 2000: the return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 692-696.
15. Murgue, B. et al. (2002) The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 267: 195-222.
16. Ostlund, E. N. et al. (2001) Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 663-669.
17. Roehrig, J. T. et al. (2002) The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 267: 223-241.
18. Snook, C. S. (2001) West Nile virus encephalomyelitis in eight horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218: 1576-1579.
19. Steinman, A. et al. (2002) Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. *Vet. Rec.* 151: 47-49.
20. Ther Abdelhaq, A. (1996) West Nile fever in horses in Morocco. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 11: 867-869.
21. United States General Accounting Office Report to Congressional Requesters (2000) West Nile virus outbreak - lessons for public health preparedness.
22. United State Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Service (2001) West Nile virus in equids in the northeastern United States in 2000.

おわりに

ウエストナイルウイルス（WNV）は、アフリカ、中東、ヨーロッパ、インドに常在している人獣共通感染症の病原体で、わが国では法定伝染病に指定されています。1999年に米国ではじめて人と馬で流行しました。その後、発生が拡大し米国にも定着しました。本病は、鳥と蚊によって感染サイクルが成立しています。現在までにウイルスの存在はわが国では確認されていませんが、感受性のある鳥類や蚊はわが国にも生息しており、わが国に侵入した場合には、まん延の危険性が強く危惧されています。日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所では、米国農務省国立獣医学研究所のE. Ostlund博士の協力で、米国で行われている馬のWNV感染症の遺伝子診断法と血清学的診断法の技術の導入を行い、診断体制の確立を行っています。

本冊子の発刊にあたり、診断法の教授をいただいた米国農務省国立獣医研究所の Eileen N. Ostlund博士とDouglas Pedersen氏、貴重な資料を提供していただいた国立感染症研究所の高崎智彦博士、ニューヨーク州農務局のSusan C. Trock博士に心からお礼を申し上げます。また資料の取りまとめに協力をいただいた栃木支所の山川武男主査に感謝します。

栃木支所におけるWNV感染症の研究は、馬事部、国際部の関係諸氏の多大な配慮と、栃木支所の職員の方々の協力のもとでなされているものです。

日本中央競馬会
競走馬総合研究所栃木支所
近 藤 高 志

刊行の馬感染症シリーズ

1. 馬伝染性貧血診断のための 寒天ゲル内沈降反応の術式	昭和51年
2. 馬伝染性子宮炎	昭和55年
3. 馬ウイルス性動脈炎	昭和56年
4. 馬のサルモネラ症	昭和56年
5. ヴェネズエラ馬脳炎	昭和57年
6. アフリカ馬疫	昭和58年
7. 馬鼻肺炎	昭和58年
8. 馬鼻肺炎ウイルス感染症のための 寒天ゲル内沈降反応の術式と応用	昭和59年
9. 馬伝染性貧血診断のための 寒天ゲル内沈降反応の術式（第2版）	昭和59年
10. 馬のピロプラズマ病	昭和61年
11. 馬の水胞性口炎	昭和62年
12. 馬の寄生虫病	昭和63年
13. 馬ウイルス性動脈炎（第2版）	平成元年
14. 馬のボトムマック熱	平成2年
15. 馬トリパノゾーマ病について	平成5年
16. 馬インフルエンザ	平成6年
17. 腺疫	平成8年
18. 子馬のロドコッカス感染症	平成8年
19. 馬鼻肺炎（第2版）	平成9年
20. 馬伝染性子宮炎（第2版）	平成9年
21. 馬原虫性脊髄脳炎	平成10年
22. 馬パラチフス	平成10年
23. 馬の日本脳炎	平成10年
24. 馬ピロプラズマ病（第2版）	平成11年
25. 馬のゲタウイルス感染症	平成11年
26. 馬ロタウイルス感染症	平成12年
27. 馬伝染性貧血の診断術式	平成13年
28. 馬の水胞性口炎（第2版）	平成13年
29. 馬の感染症	平成13年
30. 腺疫（第2版）	平成14年
31. 馬原虫性脊髄脳炎（第2版）	平成15年
32. 馬のウエストナイルウイルス感染症	平成15年

日本中央競馬会助成事業

地方競馬益金補助事業

発行 平成15年3月

社団法人 全国家畜畜産物衛生指導協会

〒106-0041 東京都港区麻布台2-2-1 麻布台ビル

TEL.03(5570)3561