

氏名(本籍)	長 峯 隆(宮崎)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙 第 91 号
位授与の日付	昭和51年11月29日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題名	馬インフルエンザワクチンに関する研究——特に流行ウイルスの分離と試作 HA ワクチンについて——
論文審査委員	(主査) 教授 斎藤 保 二 (副査) 教授 越智 勇 一 教授 今井 信 実

## 論 文 内 容 の 要 旨

### I 流行ウイルスの分離と従来株との免疫学的比較

インフルエンザ様疾患馬の急性期の鼻汁、咽頭ぬぐい液を採取、発育鶏卵で分離を試みたところ、8頭中2頭の馬よりウイルス分離が出来た。これらのインフルエンザ様疾患馬の急性期、回復期の対血清で行ったHI、中和試験の結果から急性期の血清中にはI型、Prague株、II型、Miami株に対する抗体は保有されていなかった。このことは今までこれらの馬は流行にさらされていなかったと思われた。次に回復期の血清について調べてみるとI型、Prague株に対する抗体上昇は認められずI型の流行については否定された。II型、Miami株に対する抗体は回復期の血清に抗体を保有するものが、抗体価は非常に低い一部認められ、II型の流行が疑われた。そこで今回分離したウイルスを抗原として、急性期、回復期の対血清について調べてみると、分離ウイルスに対し急性期は全然抗体は認められず、回復期に於て明らかな抗体上昇が認められ感染馬全頭に証明された。Ferret免疫血清に対する血清学的態度から見ると、分離ウイルスとII型、Miami株は抗原的に共通の部分があることが解ったが、感染馬の回復期の血清に対する態度及びニワトリ免疫血清に対する血清学的態度より明らかな差があり分離Chiba株はII型、Miami株の変異を起したものであると思われた。

### II ワクチンの試作とその抗原性

馬インフルエンザワクチンの試作にあたり、血清学的に明らかな差がみつめられたのでこの様なウイルスが流行すると、従来の標準株のI型、Prague株、II型、Miami株の2株のワクチンでは感染防御という点で不完全、不十分と考えられるので分離株を加え3株混合ワクチンの試作を考えた。

インフルエンザA型ウイルスはきわめて変異を起しやすくこれがワクチンによる予防上非常に問題の多い点である。しかしこれらのウイルスも常に新しい抗原が次々に突然変異によって生まれて来るものでなくほとんどは今まで存在した抗原単位の種類と組合せで出来るものであることは、1953年Jensenらによって調べられて良く知られていることである。1964年Davenportらの報告によるとInfluenza Swine株のIntactウイルスでモルモットを免疫すると、Swine株にのみ反応する抗体が産生されるが、エーテル処理することにより得たSwine HAで免疫すると、FM-1, PR-8, A<sub>2</sub>/AA/23/57株にも反応する抗体が産生されたという。これらのことは抗原単位の組み込みの際に検出されにくい所に入り込んだか、或は抗原決定

基をつつんでいるものが取り除かれた為にその抗原性が現われて来た等と考えられ、HAにした方が抗原性の幅が広がる場合もあると考えられている。又インフルエンザウイルスをエーテル処理することにより可溶性の脂質が除去されウイルスは粒子が細かくこわされる。これらのものをエーテル処理前、エーテル処理後のもので比較して動物試験を行うと、発熱原性、体重減少、その他、副反応が処理前に比べ非常に弱められるかほとんど認められない位にまでなる。又エーテル処理後得られた HA・HI や中和抗体を Intact と同様生産し得る。この様なことから HA ワクチンが登場した。すなわちウイルス粒子をこわし副作用を起す部分を除去するか、破壊することにより、感染防御に役立つ抗原を取り出してワクチンを作る。この様な理想的なワクチンに近ずける一歩として、HA ワクチンが開発されて来た。これらのことは人のインフルエンザで行なわれているので著者も馬インフルエンザワクチンに利用してエーテル処理することにより発熱誘発物質或は副作用物質等を除去することにより抗原量を多くすることが可能になり予防効果の面でも従来のワクチンより一層優れたものが出来ると考え応用した。著者はワクチンの抗原量を 1,500 CCA と非常に高濃度にして作成した結果、これらのワクチンを Whole virus と HA ワクチンで比較してみると発熱原性点では Whole virus ワクチンに於ては高く、HA ワクチンに於てはほとんど自然動揺程度の範囲で明らかな差があり、HA ワクチンの発熱原性の減少が認められた。又モルモット、及びマウスに於ける体重減少効果試験を行ったところ、モルモットに於ては HA ワクチンの方が体重減少も少なく、体重復元日数に於ても明らかな差が生じた。マウスに於てはあまり明らかな差は出なかったが、接種量の少ないせいかも知れないと思われた。抗原性についてはマウスの力価試験の成績より Whole virus ワクチンと HA ワクチンでは差がほとんどないと思われた。又 Davenport らが Swine 株で行なった様なエーテルでこわすことによる抗原性の幅の拡がりは認められなかった。

#### 1 試作ワクチンの安全性と接種方法

試作ワクチンの野外に於ける安全性については実験室内試験として行ったウサギ、モルモット、マウス、の結果と同様な態度を示したが、ウサギに於ける発熱試験では Whole virus ワクチンと HA ワクチン間で明らかな差が認められたが、野外試験の場合は差が認められなかった。又副反応として局所の腫脹、結核も認められず安全性についてはワクチンとして満足すべき結果を得た。

ワクチンの副作用について adjuvant の使用の適、不適によりかなりの問題があるが、諸外国に於ては、adjuvant を抗体上昇、持続、という意味で多く使用している。著者のワクチンはこれらの副作用の問題から、adjuvant を添加しないで充分な抗原量を与える為に HA ワクチンとし副反応を軽減し且つ抗体上昇をさせる上で一応満足すべき結果を得た。著者は Whole virus ワクチンと HA ワクチンとの馬に於ける抗体応答について種々の接種間隔で比較してみたが、Whole virus ワクチン、HA ワクチンとも抗体上昇は接種間隔でも認められるが、4 週間隔、2 回接種が抗体上昇と持続の点で良い様に思われた。又 Powell によると接種間隔と Booster について種々の実験を行い初回免疫後 4~6 週後に Booster 接種したグループが一番抗体上昇、持続が良かったとしているが著者らの実験と一致する結果であった。又 Booster 後再接種について LuCam らは再接種は 1 年後に行うのが適当と述べているが、著者らも 6 カ月、1 年後再接種を行い抗体を調べたところ抗体上昇、持続、が良い様である。

以上インフルエンザウイルス野外流行株の分離と有効なワクチンを開発する目的で種々の実験を試みた結果、次の様に要約される。

### 1. ウイルス分離

感染馬咽頭ぬぐい液より2株のウイルスを分離し、分離ウイルスの血清学的検索の結果、分離ウイルスは既知のAⅡ型 Miami 株とは抗原構造を異にし Miami 株の変異したものであることがわかった。尚分離株は2株とも交叉H I 試験、中和試験、等の結果より同一のものでありこの分離株が流行していたことが感染馬の対血清のH I 試験、中和試験により解った。

### 2. ワクチンの作成

新分離株と既知の株とは抗原的にひらきがあるのでⅠ型、A/Eq/Prague/1/56(Heq 1, Neq 1) 株、Ⅱ型、A/Eq/Miami//1/65(Heq 2, Neq 2)、分離、A/Eq/Chiba/3/71-(Hep 2, Neq 2) 株の3株混合ワクチン(それぞれ 500CCA, 500CCA 相当量ウイルス含量)の試作を行った。試作にあたり現在人体用に使用されている副作用の少ないHA ワクチンをモデルとして馬インフルエンザ HA ワクチンの開発を行った。エーテル処理ワクチンは Tween 30 エーテル処理の際出現する中間層に含まれるウイルス量を補正して Whole virus 相当量のウイルスを含む様に調製すれば Whole virus と同等或はそれ以上の免疫力を保持することが解った。

### 3. ワクチンの安全性

実験室内安全試験として、マウス、モルモットの体重減少効果、ウサギの発熱試験等に於て Whole virus ワクチンと HA ワクチンと比較したところ、マウスでは差を認めず、モルモットに大量接種すると24時間後 Whole virus ワクチンで平均23.5g、HA ワクチンで5.5gの体重減少を示し HA ワクチンの方が明らかに副反応が低かった。又接種前の体重に復する日数も Whole virus ワクチンでは4日、HA ワクチンでは2日と HA ワクチンの方が2倍も早く復元した。

ウサギの発熱試験の結果、Whole virus ワクチンが $1.92^{\circ}\text{C}$ で、HA ワクチンは $0.42^{\circ}\text{C}$ と Whole virus ワクチンに比べ $\frac{1}{4}$ 程度の発熱であり、HA ワクチンの $0.42^{\circ}\text{C}$ の発熱はウサギの自然動揺とも見られ HA ワクチンの発熱はないと同様に思われた。野外に於てこれらのワクチンを当歳馬10頭、3歳馬10頭につき接種副反応を調べたところほとんど体温の上昇は示さず又局所或は全身の副反応は現われず安全性の確実なワクチンであった。

### 4. 抗体の推移について

抗体の推移について調べた結果、抗体上昇は100%に認められた。接種間隔が一番良いと思われたのは4週間隔2回接種群で6カ月、1年後に補強免疫を行うと Booster 効果により明らかな抗体上昇が認められた。又マウスに免疫することにより保存実験を行ったところ各株とも $4^{\circ}\text{C}$ 、12カ月間、抗原の変化なく免疫を賦与することが解った。

以上エーテル処理馬インフルエンザ HA ワクチンは Whole virus ワクチンと比較して免疫原性の点では同等或はそれ以上で副反応の点でもかなり優れている上保存期間も長く良好な免疫を賦与する優れたワクチンであることが証明された。

## 論文審査の結果の要旨

馬のインフルエンザは急性呼吸器感染症であり、人のインフルエンザと同類の疾病である。

病原ウイルスが初めて発見されたのは、1956年、チェコスロバキの流行時にⅠ型、A/Equine/Prague/56

(Heq1 Neq1), ついで1963年にアメリカ合衆国フロリダ州に於て I 型と抗原的に異った II 型, A/Equine/Miami/1/63 (Heq2 Neq2) が分離された。

これらの馬のインフルエンザウイルスは、人の A 型ウイルスとは抗原的には異なるが、最近、人に流行を見た香港株とは II 型の HA・抗原構造に共通のところが、その電顕所見もウイルスは長いフィラメント状をなして近似している。これらのことはウイルスが人と馬の間で交雑する可能性を示して興味深い。

わが国に於て馬のインフルエンザは1971年12月より1972年3月にいたる間に競走馬の中に大流行があり、これが為に競馬の開催が不可能となり、物議をかもしたことは未だ耳に新しい。

本病の予防については、人と同様にワクチンの作出が行われ、初期は人型、タイプ A インフルエンザワクチンが用いられたが、1965年以降、馬独自のワクチンが開発され、種々のアジュバントを加えたものが試作されているが、副反応などの点で問題がある。

近来、家畜のワクチンもその効力をもとより、副作用の少ないものが要求されるので、特に高価な、且刺戟に鋭敏な競走馬用のワクチンとして反応の少ない、防御効果の高いものを作出することが望まれている。著者は自己の人インフルエンザワクチン製造に関する多年の経験を生かして、自ら流行時に千葉船橋競馬場の罹患馬からウイルスの分離を行い、これをもととして、HA ワクチンを試作し、実験動物、並に馬に対する野外試験を行ってその効果を確かめ、従来のワクチンと比較して、副作用の少ない、秀れたワクチンであることを証明した。以下、ウイルス分離、ワクチン作出法、安全ならびに効力試験などの概要を記述する。

## I ウイルスの分離とその抗原的性質

インフルエンザ様疾患馬 8 頭中、2 頭の急性期の鼻汁、咽喉頭ぬぐい液からウイルスを分離した。

上期の疾患馬の急性期と回復期の血清についてウマインフルエンザウイルス A I 型 (Praque 株) と II 型 (Miami 株) の HI ならびに中和抗体の有無をしらべたところ、回復期の血清に II 型に対する抗体の上昇がわずかに認められた。又、分離ウイルスはフェレットを用いての免疫による血清学的態度から II 型に抗原的に共通部分があることが解った。しかし、感染馬の回復期の血清とニワトリを用いての免疫による血清態度からは、II 型とは明らかな差があり、分離した Chiba 株は II 型 Miami 株の変異したものと考えられた。

## II ワクチンの試作と防御効果、安全試験等

上記のように新分離株と従来の株との間には抗原的に差異があるので、I 型, A/Eq./Praque1/56 (Heq1 Neq1) 株, II 型, A/Eq./Miami/1/65 (Heq2. Neq2) と分離株 A/Eq./Chiba/3/71 (Heq2. Neq2.) の 3 株を用いて混合ワクチンを 2 種類試作した。即ち各株のウイルスを 50CCA 相当量含有する Whole ウイルスワクチンと HA ワクチンである。

前者はウイルス粒子を破壊せず、フォルマリンで不活化したものであり、後者はウイルス原液に Tween 80 を加え、更にエーテル処理を行い、ウイルス粒子を破壊すると共に、被膜の脂質を除去し、副反応物質を除いた後、フォルマリンを加え不活化したものである。

2 種のワクチンについてその防御効果と安全性を実験動物を用いて比較して見ると、両者はほとんど同じ程度であるが、発熱原性、体重減少の点では HA ワクチンは Whole ウイルスワクチンに較べて遙かに秀れており、体温の上昇もなく、体重減少も殆ど認められなかった。又、1 年間 4°C に保存したワクチンは両者共に抗原性に殆ど変化がなかった。

### Ⅲ 野外試験と抗体産生

当歳馬10頭、3歳馬10頭について頸側皮下に1.0ml宛、Whole ウイルスワクチンと HA ワクチンを接種し、安全性を調べたが両者共発熱、全身症状、局所反応などについて全く異常がなかった。

抗体産生については1回接種、2週間隔2回接種、4週間隔3回接種の各々を2種のワクチンについて行い、抗体の上昇を見たが、いずれも抗体上昇が認められるが、特に HA ワクチンの4週間隔2回接種が抗体上昇と持続の点で良好であり、booster 効果は初回免疫後、4～6週で行うことが最も良い結果を得、booster 後の再接種は6ヵ月、1年後が抗体上昇、持続共に良好であった。

自然感染耐過馬に対し、試みに両ワクチンを接種したところ、いずれも2週間隔2回接種で HI および中和抗体の上昇が極めて良好で、ほとんど1回接種でピークに達した。

以上のように著者は人のインフルエンザワクチンをモデルとして馬インフルエンザ HA ワクチンの開発を試みるため、自身で流行地より分離したウイルスと従来株の3種を混合しフォルマリン不活化 Whole ウイルスワクチンと Tween 80 エーテル処理による HA ワクチンを試作してその免疫効果ならびに安全性などを実験動物と野外の馬を用いて試験を行った結果 HA ワクチンは免疫効果に於ては Whole ウイルスワクチンと同等であり安全性に於てはこれに勝る成績を得た。これらの業績は今後、家畜ワクチンの改良上、大いに貢献するものであり、学理的にも重要な作業として獣医学博士を授与するに値することを認める。