

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—

北 里 研 究 所

長 峯 隆

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—

北 里 研 究 所

長 峯 隆

指 導 : 北 里 研 究 所

部 長 齊 藤 保 二 博 士

目 次

本 文 目 次	(1) ～ (3)
図 及 び 表 の 目 次	(4) ～ (6)
緒 言	1
材 料 と 方 法	3
1. ウイルス分離材料	3
2. ウイルス	3
3. 免疫血清	3
4. 孵化鶏卵	3
5. 血清学的測定法	4
(1) 赤血球凝集反応	4
(2) 赤血球凝集抑制反応	4
(3) 中和反応	4
6. 試作ワクチン	4
(1) 使用ウイルス株	5
(2) 不活化法	5
(3) ワクチン製法	5
(4) ワクチン原液分画試験	7
(5) エーテル否定試験	7
(6) 安全試験	8
(イ) モルモット試験法	8
(ロ) マウス試験法	8
(ハ) ウサギ発熱試験法	8

(7) 力価試験	9
(8) ワクチン保存試験	9
(9) 副反応	9
(イ) 接種局所及び全身反応	9
(ロ) 発熱反応	10
7. ワクチン接種法	10

実験成績

1. 馬インフルエンザウイルス分離成績	11
(1) ウイルス分離	11
(2) ウイルスの同定	11
2. 馬インフルエンザ試作ワクチン成績	15
(1) ホルマリンの精製濃縮液に対する作用	18
(2) Detergentとしてエーテルを使用した時の処理 前, 後のCCAの変化について	18
(3) 試作ワクチン分画試験	23
(4) 試作ワクチンの安全試験について	23
(5) マウスに於ける力価試験について	30
(6) ワクチン保存試験	35
3. 試作ワクチンの野外成績	35
(1) 野外馬に於ける安全試験	35
(2) 抗体産生及び抗体の推移について	35
a) 1回接種群のHI及びNT抗体の推移について	35
b) 2週間隔2回接種群のHI及びNT抗体の推移 について	40

c)	4 週間隔 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 について.....	40
d)	2 週間隔 3 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 について	40
e)	自然感染馬 2 週間隔 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移について	47
(3)	抗体持続と補強免疫について	47
考	察	51
結	論	59
謝	辞	62
参 考 文 献	63
英 文 抄 録	80

図及び表の目次

図目次

図 1.	Purification procedure of Equine Influenza Virus.....	6
図 2.	A/Eq/Prague/1/56 株 Formalin による不活化	19
図 3.	A/Eq/Miami/1/63 株 Formalin による不活化	20
図 4.	A/Eq/Chiba/3/71 株 Formalin による不活化.....	21
図 5.	密度勾配遠心による沈降態度について A/Eq/Prague/1/56 株	24
図 6.	密度勾配遠心による沈降態度について A/Eq/Miami/1/63 株	25
図 7.	密度勾配遠心による沈降態度について A/Eq/Chiba/3/71 株	26
図 8.	電子顕微鏡写真 A/Eq/Prague/1/56 株 Whole virus 及び Et ₂ O treated virus	27
図 9.	電子顕微鏡写真 A/Eq/Miami/1/63 株 Whole virus 及び Et ₂ O treated virus	28
図 10.	電子顕微鏡写真 A/Eq/Chiba/3/71 株 Whole virus 及び Et ₂ O treated virus	29
図 11.	ワクチンの保存試験.....	36
図 12.	馬のワクチン接種による体温の変動.....	37
図 13.	Whole vaccine 1 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移	38
図 14.	HA vaccine 1 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移	39
図 15.	Whole vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移(1).....	41

図16. HA vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1)..... 42

図17. Whole vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移(2)..... 43

図18. HA vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (2)..... 44

図19. Whole vaccine 3 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 45

図20. HA vaccine 3 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 46

図21. 自然感染馬 Whole vaccine 2 回接種群の HI 及び
NT 抗体の推移 48

図22. 自然感染馬 HA vaccine 2 回接種群の HI 及び
NT 抗体の推移 49

図23. 補強免疫試験 50

表目次

表 1. 分離ウイルス材料と分離当所の HA 価	12
表 2. フェレット血清での HI 試験による抗原分析	13
表 3. ニワトリ免疫血清による分離ウイルスの抗原分析	14
表 4. ニワトリ免疫血清による中和試験	16
表 5. 感染馬血清による HI 及び中和抗体価	17
表 6. エーテル処理による CCA の態度	22
表 7. モルモット安全試験	31
表 8. マウスに於ける安全試験	32
表 9. ウサギに於ける発熱試験	33
表 10. マウスによる馬インフルエンザ力価試験	34

緒 言

馬インフルエンザはミクソウイルス群に属し馬特有の急性呼吸器伝染病でその流行の規模と速度は他の伝染病のそれを遙かにしのいでいる。1956年、東ヨーロッパ、チェコスロバキアで大流行があり Sovinova^⑧らによって初めて I 型 A/Equine/Prague/1/56 (Heq 1 . Neq1) が分離された。

それ以前から Bryans^⑫、Berveridge^④ら、McQueen^{⑤⑧}ら、の報告によると I 型は北米及び欧州各地に広く蔓延していた。1963年にはアメリカ合衆国フロリダ州マイアミの感染馬から Waddell^⑥らによって I 型とは抗原的に異なる II 型 A/Equine/Miami/1/63 (Heq 2 Neq 2) が分離された。

尚これらの II 型ウイルスが 1962 年以前に南北米大陸及び欧州に存在した形跡は Berveridge^④ら、McQueen^⑤ら、の調査報告によるとなかった。これら I、II 型ウイルスの流行はその後もアメリカや欧州に於ては見られたが我が国に於ては発生はみられなかった。しかしながら 1971 年 12 月から 1972 年 3 月頃まで我が国に於ても輸入馬に起因すると見られる馬インフルエンザ様疾患の発生があり、^{⑤⑥⑦}初めての流行で各競馬場とも競馬が一時中止され物議をかもしだす結果となった。^{①, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧, ⑨, ⑩, ⑪, ⑫}馬インフルエンザに対する有効な治療法は未だ一般的に実用の域に達していない現在、^{①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧, ⑨, ⑩, ⑪, ⑫}ワクチン接種が唯一の予防法とし

て行なわれている。血中抗体をある程度以上、上昇させておけば罹患率が低下することがインフルエンザウイルス感染に於て動物実験^⑦、或は疫学的調査と血清学的研究^{②,④}等から主張され副作用のないしかも抗原量の高い安全なワクチンの開発が望まれ種々検討されている。^⑧

馬インフルエンザワクチンについては初めは人型タイプ A インフルエンザワクチンによるワクチネーションが応用され、^{⑤,⑥,⑧,⑨,⑩} 馬独自のインフルエンザワクチンが開発される様になったのは 1965 年以降のことである。^{⑨,⑩,⑬} 又 1967 年以降 sodium alginate や水酸化アルミニウム、Freund adjuvant 等を添加して抗体上昇、持続、をうながす様なワクチンの研究も行なわれて来ている。^{⑫,⑭,⑮} しかしながら adjuvant を使った場合、副反応として硬結、潰瘍形成等種々の問題が未解決であるし使用上の不安が多すぎる。更に抗原の精製を行い、感染防御抗原のレベルまで精製してその上で adjuvant を考えるべきであろうと思われる。著者は馬インフルエンザ様疾患発生流行中、感染発症馬の鼻汁、咽頭ぬぐい液より 2 株のウイルスを分離することが出来たのでその成績とそのウイルスを使用して現在精製技術その他の点で進歩していると思われる人インフルエンザ Hemagglutinin Vaccine をモデルにして馬インフルエンザワクチンの試作を行い、副作用の少ない有効なワクチンを作成し野外試験を行った

ので以下それらの成績について報告する。

材料と方法

1. ウイルス分離材料

インフルエンザ様疾患馬より滅菌綿棒にて鼻汁及び咽頭ぬぐい液を採取し綿棒をペニシリン 500 u/ml, ストレプトマイシン 500 I/mlを含むブイヨン (pH 7.2) 10 ml 中に挿入, 綿棒に附着, 浸漬した鼻汁及び咽頭ぬぐい液を圧出振盪して浸出液を作りこれを 1,500 rpm 5 分遠心, その上清を分離材料とし, 11 日孵化鶏卵の羊膜腔, 漿尿膜腔内に各々 0.2 ml 宛接種, 33°C ~ 35°C, 72 時間培養后, 羊膜腔液, 漿水膜腔液を別々に採取し, 赤血球凝集反応によりウイルスの増殖の有無を調べた。

2. ウイルス

標準ウイルスとして I 型 A/Equine/Prague/1/56 (Heq 1 . Neq 1), II 型 A/Equine/Miami/1/63 (Heq 2 . Neq 2) 株を使用した。これらのウイルス株は国立予防衛生研究所より分与を受けた。

3. 免疫血清

分離ウイルス同定用免疫血清は標準株の Ferrt 感染血清とニワトリ免疫血清を使用した。

4. 孵化鶏卵

分離には 8 ～ 9 日孵化鶏卵，中和試験には 11 日孵化鶏卵を使用した。

5. 血清学的測定法

- (1) 赤血球凝集反応^{⑪⑫} (Hemagglutinin test 略して HA test) 感染羊膜腔液，漿尿膜腔液を M/100 P.B.S (Phosphate Buffer Saline) pH 7.2 にて 2 倍階段希釈し，0.5% ニワトリ赤血球とを各々 0.5 ml 混和，室温にて 60 分静置后管底凝集像により判定した。
- (2) 赤血球凝集抑制反応 (Hemagglutination Inhibition test 略して HI test) HI 試験に使用した抗原はウイルス感染漿尿液を 3,000 rpm，10 分間遠心しその上清に 0.02 V/V% になる様にホルマリンを添加し不活化したものを使用した。術式は WHO^⑭ 術式で行い，抗原は 16 u/ml を使用し血清終末希釈倍数で示した。
- (3) 中和反応 (Neutralization test 略して NT test) 血清を 56°C，30 分間非動化し，それをブイヨンにて 2 倍階段希釈し， 10^3 EID₅₀ のウイルスを等量混和后 37°C，30 分 incubate し，1 希釈 0.2 ml ずつ 5 ケの 11 日孵化鶏卵漿尿膜腔内に接種，33°C～35°C，48 時間培養后，漿尿膜腔液中のウイルス増殖の有無を HA 試験により判定した。

6. 試作ワクチン

(1) 使用ウイルス株

A/Equine/Prague/1/56 (Heq1 . Neq1)

A/Equine/Miami/1/63 (Heq2 . Neq2)

A/Equine/Chiba/3/71 (Heq2 . Neq2) 分離株

上記三種のウイルス株を用いた理由は抗原変異が認められたためである。(著者らの報告^③)

(2) 不活化法

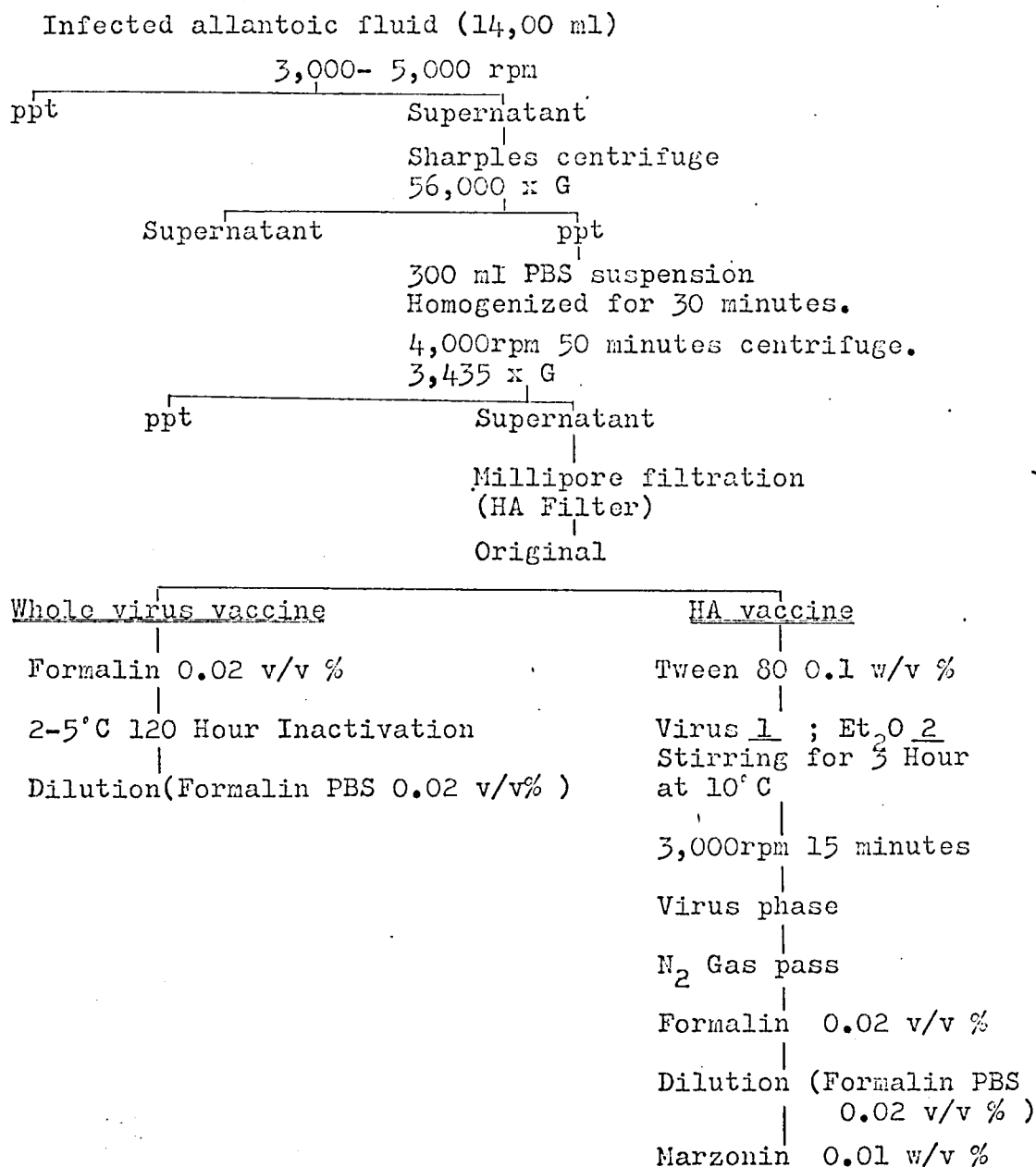
ワクチン用濃縮原液を適当に希釈し、種々の濃度のホルマリンを添加して経時的に11日孵化鶏卵尿膜腔内に試料0.2 ml/Egg, 5ヶの卵に接種, 48時間, 33°C~35°Cで培養後, 漿尿液を採取, 等量のニワトリ0.5%血球を加えHAにて判定, ホルマリンの濃度と時間的な関係について調べた。

(3) ワクチン製法

原液はウイルス株をそれぞれ別個にM/100 PBS pH 7.2で 10^{-4} に希釈し11日孵化鶏卵の漿尿膜腔内に接種し33°C~35°C, 48時間, 培養後, 漿尿膜腔液を採取しこれらのウイルス浮遊液を5000 rpm連続遠心しその上清を超遠心法により精製濃縮して原液とした。(図1)

VaccineはWhole virus (Intact virus) VaccineとHemagglutinin Vaccine (HA Vaccine)の2種類で, Whole Virus Vaccineは原液にホルマリンを0.02 v/v%に加え2~5°Cに

图 1



Purification procedure of Equine Influenza Virus

て 120 時間で不活化した。原液のウイルス量を測定^{⑥)}し 500 CCA/ml に各ウイルス株が含まれる様に M/100 PBS pH 7.2 で希釈し防腐剤としてチメロサル 0.01 W/v % になる様に加えた。

HA Vaccine は原液に Tween 80 を 0.1 W/v % に加え攪拌后, エチルエーテルを 2 容加え 10°C にて 3 時間攪拌后, 3000 rpm 15 分間遠心し, 液層を採取し N₂ gas 通気下で残余エーテルを除去し HA Vaccine 原液とし Formalin 0.02 v/v % 加えエーテル処理前の Whole Virus 換算で各ウイルス株を 500 CCA/ml 相当量に含む様に M/100 PBS . pH 7.2 にて希釈し, 防腐剤としてチメロサルを 0.01 W/v % になる様に加えた。

(4) ワクチン原液分画試験

密度勾配用遠心管 (直径 ½ , 長さ 2 インチ) 2 本に 1 本当り 20 % 及び 60 % 分画用蔗糖液を用いて全量 4.8 ml の 20 ~ 60 % 蔗糖濃度勾配を作る。検体を 20 % 分画用蔗糖液で約 300 CCA/ml に希釈し, 0.2 ml を遠心管に重層し Swing bucket type Rotor (最大有効遠心半径 9.8 cm) を用い 4 ± 1°C , 30,000 rpm . 90 分遠心し それらを分画し上層分画中に HA のピークが来ることを確かめた。

(5) エーテル否定試験

HA Vaccine を 37°C 10 分間加温后, 開栓し直ちに火気に

近づけ引火しないことを確認した。

(6) 安全試験

生物学的製剤基準^④（厚生省編）に準じ試験を行った。

(イ) モルモット試験法

モルモットの体重 350 g 以上のものを用い使用前 5 日以上観察して異常を示さずかつその体重が順調に推移したものの 2 匹以上の腹腔内に 5.0 ml のワクチンを接種し 1 週間体重の変化を測定した。

(ロ) マウス試験法

約 4 週令のマウスを用いる。動物は使用前 5 日以上観察して、異常を示さずかつその体重が順調に推移したものの 2 匹以上を用い検体を 1 回腹腔内に 1 匹宛 0.5 ml ずつ接種 10 日間観察した。

(ハ) ウサギ発熱試験法

ウサギの耳静脈に Vaccine 1 ml/kg (300CCA, 300CCA 相当量に pyrogen free の生理的食塩水にて希釈) 接種して発熱原性の有無を測定した。測定には 3 匹の健康家兎を使用し、使用の 16 時間前から試験の終るまで水以外の給餌はせず、直腸で体温の測定を行い注射前の体温を対照体温とし注射後 30 分間隔で測定し注射後 6 時間まで測定した。判定は 3 匹の発熱反応の和が 1.3°C 以下の場合

を陰性としそれ以上のものを陽性とした。但し発熱反応とは、測定値と対照体温との差を求め、これを差体温とする。差体温の最大値をその試験動物の発熱反応とした。

(7) 力価試験

マウスを免疫し産生された中和抗体価を卵を用いて測定した。測定法はワクチン希釈で行いワクチンを $5^2 \sim 5^6$ まで希釈し各段階、生后4週のマウス10匹ずつ腹腔内に0.5 mlずつ接種して免疫注射后21日目にすべてのマウスからほぼ等量ずつ採血し各群ごと集めて血清を採り 56°C 30分間非動化してブイヨンにて2倍に希釈、希釈血清と各攻撃用ウイルス浮遊液との等量を取り良く混ぜて $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 30分おいたのち各混合をそれぞれ5ヶの卵に1個当たり0.2 mlを漿尿膜腔内に注射し $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ にて48時間おいた后、それぞれの卵の漿尿膜腔液を個別に採り、ニワトリ赤血球を用いてHAを調べた。又 challenge virus は卵に接種し EID_{50} を求めた。

(8) ワクチン保存試験

ワクチンを 4°C に保存した場合の保存態度について12ヶ月間マウスを免疫してHI試験で追跡した。

(9) 副反応

(1) 接種局所及び全身反応

野外馬にワクチネーションを行い1週間局所の腫張，及び全身反応について観察した。

(ロ) 発熱反応

当才馬10頭，三才馬10頭につき頸側皮下1.0 ml接種，朝，夕，体温測定を行った。

7. ワクチン接種法

下記の様な方法でワクチンの接種及び採血を行い各週ごとに中和，HI試験を行った。

第一群：1.0 ml 皮下1回接種

第二群：1.0 ml 皮下2回接種，接種間隔2週間

第三群：1.0 ml 皮下2回接種，接種間隔4週間

第四群：1.0 ml 皮下3回接種，接種間隔2週間

第五群：自然感染馬

1.0 ml 皮下2回接種，接種間隔2週間

各群ともWhole virus vaccineとHA Vaccineを当才～15才までの馬各々10頭ずつ使用した。但し自然感染馬についてはHA Vaccine 5頭，Whole virus vaccine 5頭ですべて4才以上であった。

実 験 成 績

1. 馬 インフルエンザ ウイルス 分離 成績

(1) ウイルス 分離

ウイルス分離材料を孵化鶏卵に接種した結果，表 1 の如く羊膜腔液中にニワトリ赤血球を凝集するウイルスが分離出来た。千葉県船橋競馬場の № 1， № 5 の馬より分離したウイルスを Chiba-2， Chiba-3 株とした。

(2) ウイルスの 同定

同定試験は Ferret の免疫血清を使用して行った。表 2 に示す如く分離した 2 株とも I 型 Prague 株の血清に対しては 16 倍以下で II 型 Miami 株の血清に対しては 512 倍と反応した。これらのことから分離ウイルスは II 型と同定した。

次にニワトリの免疫血清を使用して同定試験を行ったのが，表 3 で分離 Chiba 2 株， Prague 株， Miami 株のニワトリ免疫血清と交叉 HI 試験の結果， 1 : 2048 HI 価あった Prague 株免疫血清に対して他の株は 1 : < 8 と反応はみられなかった。又 1 : 1024 HI 価をもった Miami 株の血清に対しては Prague 株は反応せず分離 Chiba， 2 株では 1 : 512 HI 価， 1 : 256 HI 価と Miami 株の血清に対して 2 ~ 4 倍の違いであった。分離株相互に於ては全く変らず良く反応した。又ニワトリ免疫血清による中和試験の態度について示したのが

表 1

分離ウイルス材料と分離当所の H A 価

競馬場	馬 No.	継代数 (HA)		
		初代	2代	3代
船橋	1	+ (16) [※]	+	+ (32)
	2	—	—	—
	3	±(≤2)	—	—
	4	—	—	—
	5	+ (2)	+ (4)	+ (64)
府中	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—

※ ニワトリ赤血球による HA (Hemagglutination) titer

表 2

フェレット血清での H I 試験による抗原分析

Virus	Ferret antisera	
	A/eq/prague/1/56	A/eq/Miami/1/63
A/eq/Prague/1/56 (Heq 1. Neq 1)	1024	< 16
A/eq/Miami/1/63 (Heq 2. Neq 2)	< 16	1024
分離 chiba-2	< 16	512
分離 chiba-3	< 16	512

antigen 16u/ml 使用

表 3

ニワトリ免疫血清による分離ウイルスの抗原分析

Antiserum * Antigen	A/eq/prague/1/56 (Heq1 Neq1)	A/eq/Miami/1/63 (Heq2 Neq2)	A/eq/Chiba/2/71 (分 離 株)	A/eq/Chiba/3/71 (分 離 株)
A/eq/prague/1/56 (Heq1 Neq1)	2048	< 8	< 8	< 8
A/eq/Miami/1/63 (Heq2 Neq2)	< 8	1024	512	256
A/eq/Chiba/2/71 (分 離 株)	< 8	512	512	512
A/eq/Chiba/3/71 (分 離 株)	< 8	512	512	512

antigen.16u/ml

表 4 で Prague 株血清に対する Miami 株，分離 Chiba 株の態度は $1 : <10$ ， $1 : <10$ で Prague 株に対して他の株は中和反応は成立しないことが解り，Miami 株の血清に対しては Miami 株で $1 : 320$ ，Chiba 株に対して $1 : 20$ ，Chiba 株の血清に対して Chiba 株は $1 : 320$ ，Miami 株に対しては $1 : 20$ で Miami 株と Chiba 株の間では同じ株間と比べると明らかな差が認められた。更に罹患馬血清の HI 反応，中和反応，について船橋競馬場の 5 頭の馬について急性期，回復期，の対血清を使って I 型 Prague 株，II 型 Miami 株，Chiba 株のウイルスで調べたところ表 5 に示す様に Prague 株に於ては急性期，回復期，とも抗体上昇は全く認められなかった。Miami 株に於ては急性期の血清では抗体上昇は認められなかったが回復期血清で HI 試験に於て，5 例中 2 例，中和試験で 5 例中 3 例，Chiba 株に於ては急性期は抗体価は認められなかったが，回復期で HI 試験，中和試験に於て 5 例中 5 例，抗体上昇が認められた。これらのことから Miami 株と分離 Chiba 株との間では HI 試験，中和試験の結果から差のあることが明らかに示され抗原変異を起していると思われる。尚分離 Chiba-2 株，Chiba-3 株は交叉 HI 試験等の結果より同一のものであることがわかった。

表 4

ニワトリ免疫血清による中和試験

challe anti virus serum	A/eq/Prague/1/56 (Heq1.Heq1)	A/eq/Miami/1/63 (Heq2.Neq2)	A/eq/Chiba/3/71 (Heq2.Neq2) 分離株
A/eq/prague/1/56 (Heq1.Neq1)	320	< 10	< 10
A/eq/Miami/1/63 (Heq2.Neq2)	< 10	320	20
A/eq/Chiba/3/71 (Heq2. Neq2) 分離株	< 10	20	320

* A/eq/Praque/1/56 $10^{3.0}$ EID₅₀
A/eq/Miami/1/63 $10^{3.0}$ EID₅₀
A/eq/Chiba/3/71 $10^{3.0}$ EID₅₀

表 5

感染馬血清による H I 及び中和抗体価

Horse No.	antigen or challenge virus	* H I 試 験		**中 和 試 験	
		急性期	回復期	急性期	回復期
1	A/eq/Prague/1/56	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Miami/1/63	< 8	8	< 5	5
	A/eq/Chiba/3/71	< 8	128	< 5	80
2	A/eq/Prague/1/56	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Miami/1/63	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Chiba/3/71	< 8	128	< 5	80
3	A/eq/Prague/1/56	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Miami/1/63	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Chiba/3/71	< 8	32	< 5	20
4	A/eq/Prague/1/56	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Miami/1/63	< 8	< 8	< 5	5
	A/eq/Chiba/3/71	< 8	32	< 5	20
5	A/eq/prague/1/56	< 8	< 8	< 5	< 5
	A/eq/Miami/1/63	< 8	8	< 5	5
	A/eq/Chiba/3/71	< 8	128	< 5	160

* antigen 16u/ml 使用

* * challenge virus

A/eq/Prague/1/56 10³⁰EID₅₀

A/eq/Miami/1/63 10³⁰EID₅₀

A/eq/Chiba/3/71 10³⁰EID₅₀

2. 馬インフルエンザ試作ワクチン成績

(1) ホルマリンの精製濃縮液に対する作用

図1で示した様な精製法で濃縮した原液を適当な濃度に希釈し、これにホルマリンを Final, 0.5, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01%の割合に添加, 0~120時間, 12段階に分け不活化の状態を4°Cと37°Cに於て比較したのが, 図2, 図3, 図4で各株とも濃度を高くすれば非常に早く不活化が行なわれることを示し, ホルマリン0.5%では各株, 各温度ともHAの低下が明らかに見られた。0.02%ホルマリン添加, 4°Cでの不活化を見ると Prague株で120時間, Miami株で24時間, Chiba株で48時間, で不活化され, 37°Cに於ては Prague株で48時間, Miami株で6時間, Chiba株で12時間, で不活化されている。著者らはホルマリンの量が多くなると抗原性の低下その他, 接種時の疼痛等の点から0.02%の濃度が適当と思われるのでこの濃度で作製したワクチンを以下の実験に供した。

(2) Detergentとしてエーテルを使用した時の処理前後のCCAの変化について

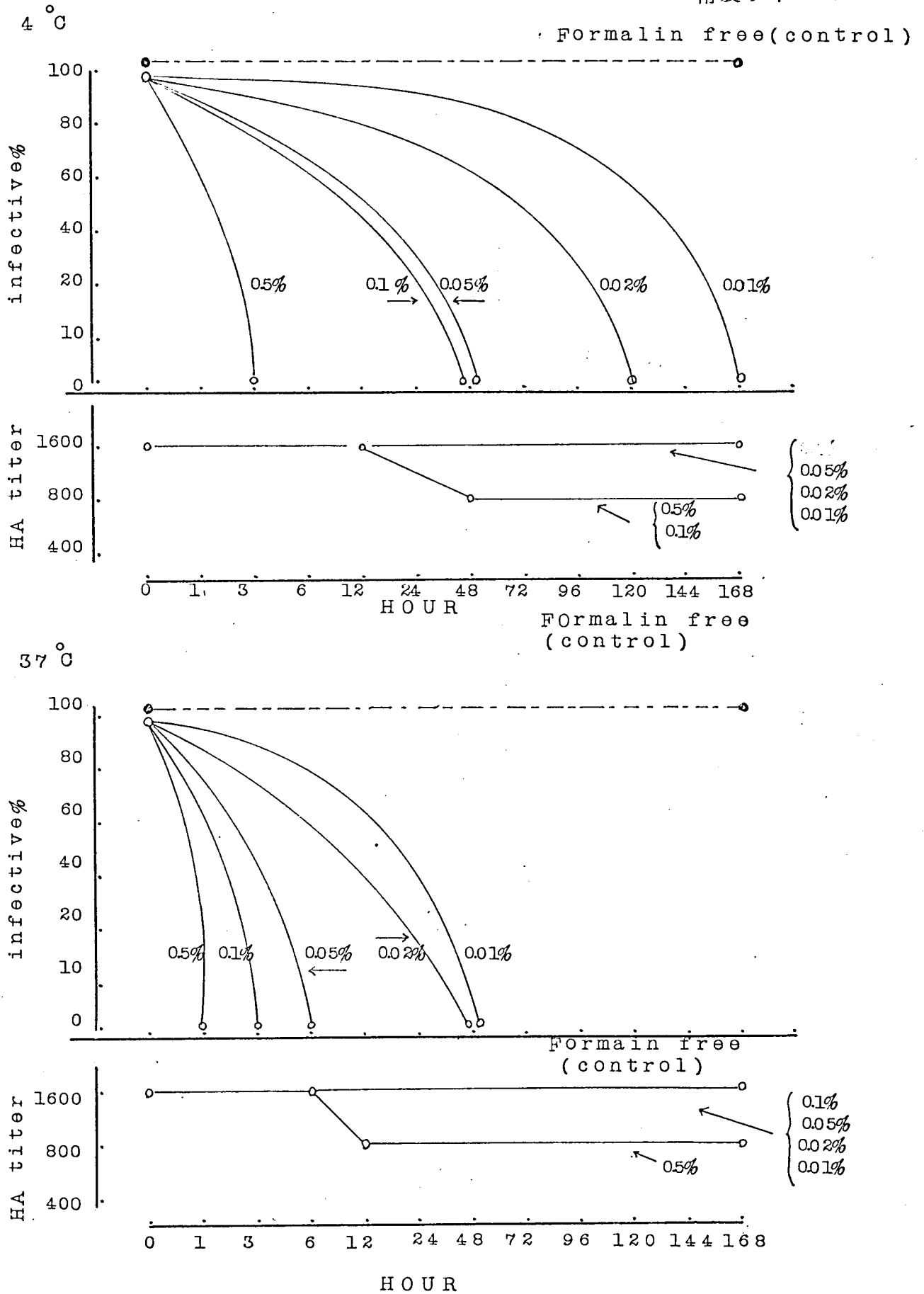
濃縮原液に Tween 80 添加, 攪拌及びエーテル添加, 攪拌, 前後の液層及び中間層のCCAの値を示したのが表6でエーテル処理により約3.1倍CCAが上昇している。特に Miami

図 2

A/eq/prague/1/56

Formalinによる不活化

精製ウイルス



A/eq/Miami/1/63 Formalinによる不活化 精製ウイルス

図 3

Formalin free
(control)

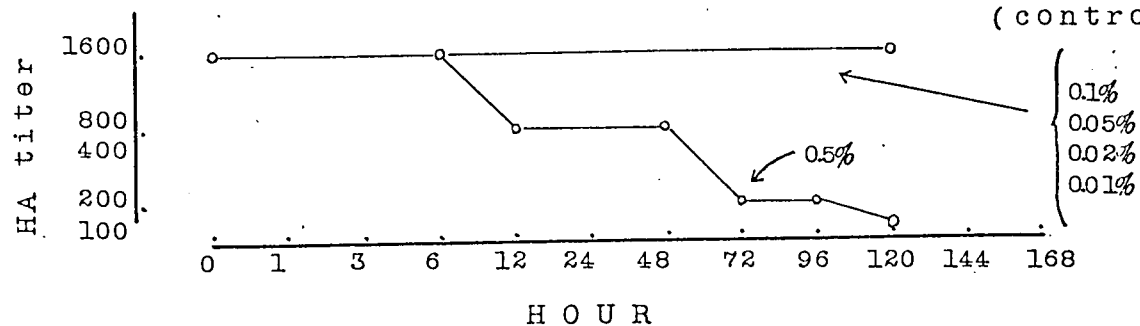
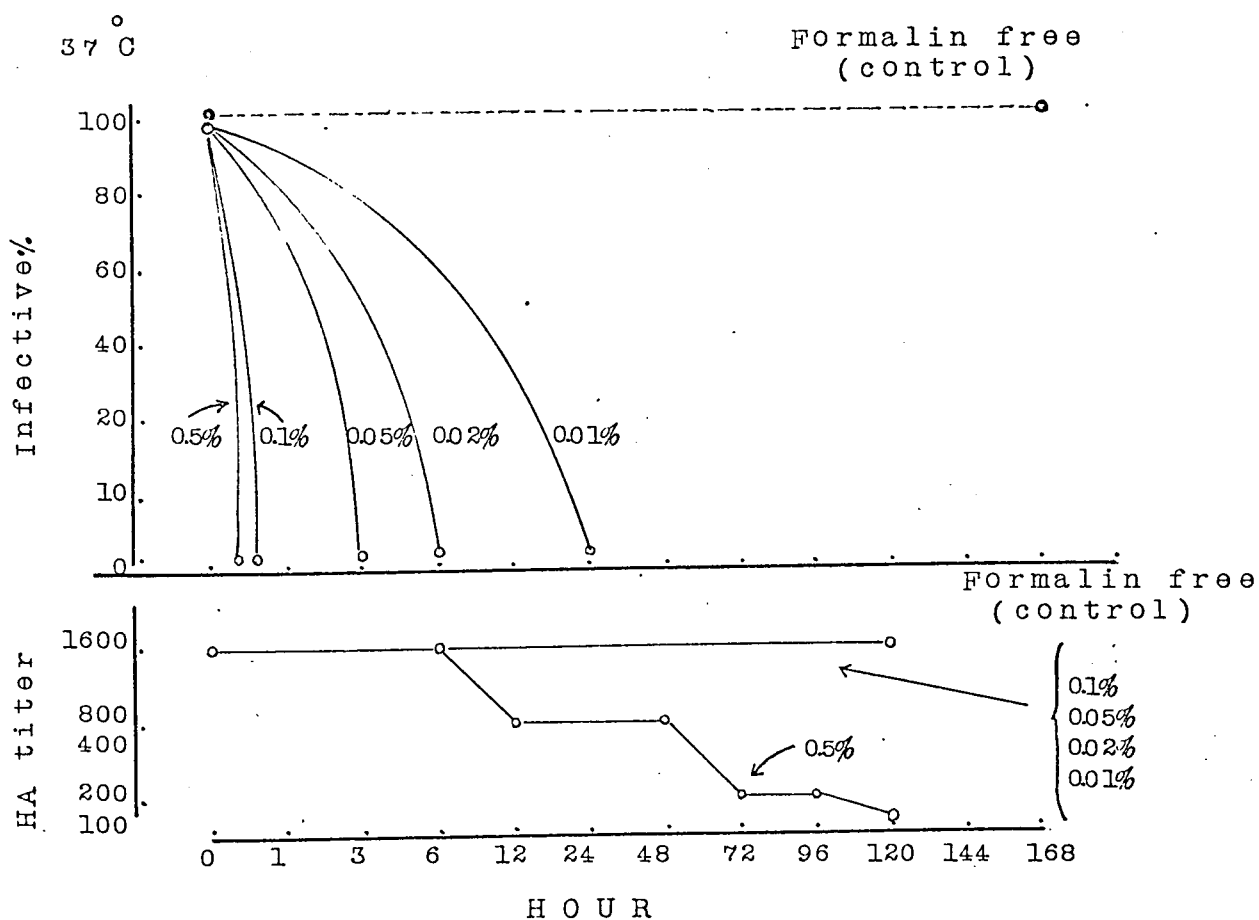
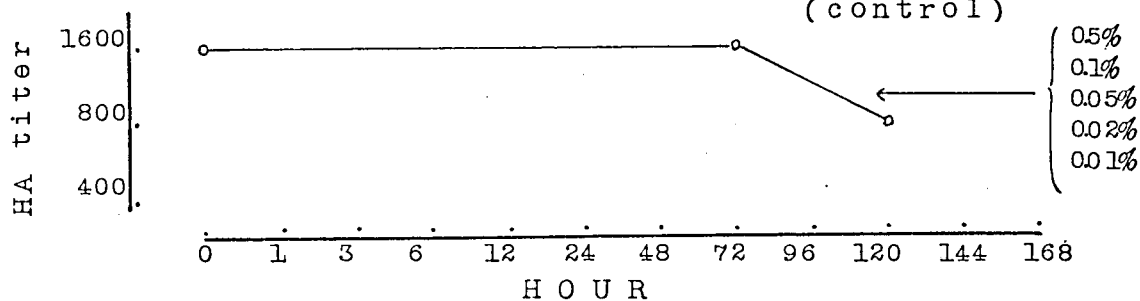
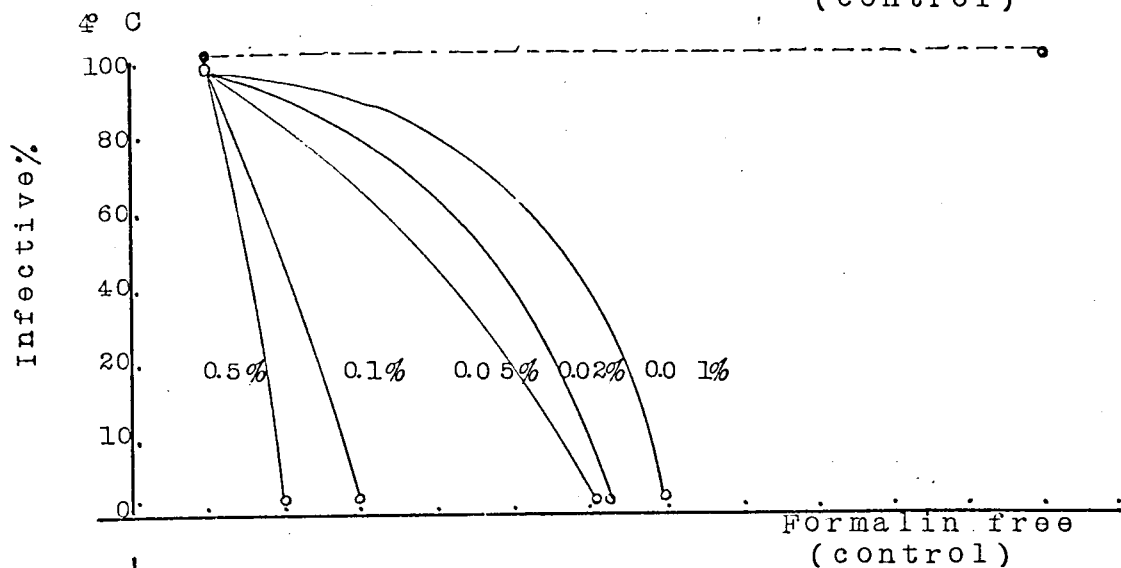


図4

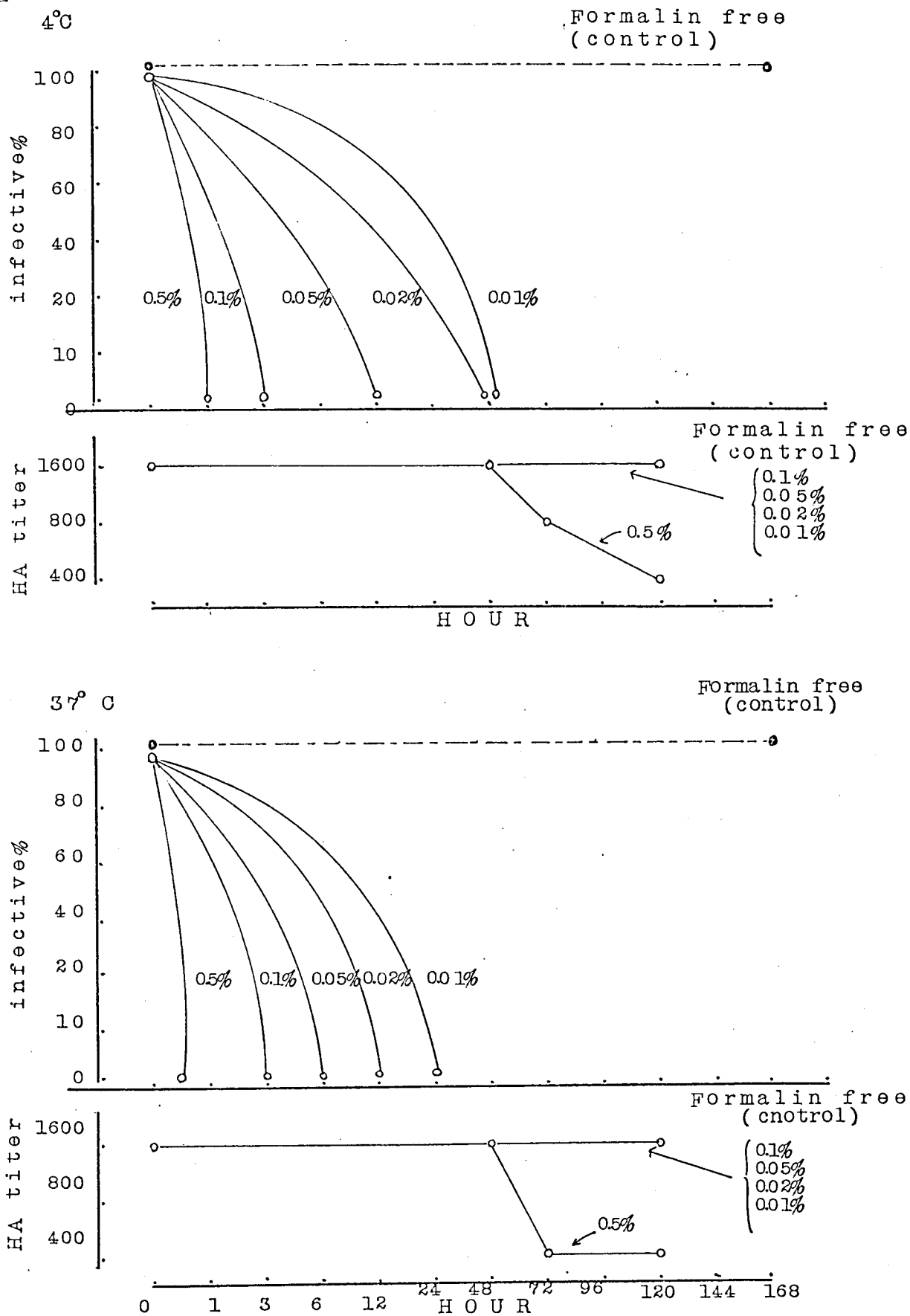


表 6

エーテル処理による C C A の態度

Phase Strain	Original CCA	Water Phase CCA ①	%	Inter Phase CCA ②	%	Total % ①+②+Original
A/eq/Prague/1/56	2560	6300	76	1991	24	324
A/eq/Miami/1/63	6720	14500	60	9596	40	359
A/eq/Chiba/3/71	2000	4000	80	996	20	248

株では中間層に 40 % と非常に高い CCA 価が移行している。これを再び M/100 PBS pH 7.2 に浮遊させエーテルで再処理すると 10 % 位に減少する。中間層への移行度は原液の精製度が進めば減少する傾向にある。ワクチンには中間層を除去し、液層のみを使用した。尚これらの中間層のウイルス量を補正してワクチンは作成した。

(3) 試作ワクチン分画試験

試作ワクチンが Whole virus vaccine と比べてどの程度ウイルス粒子が Detergent でこわされ細かくなっているかを知る為に試作ワクチン単味各々を蔗糖密度勾配遠心にかけてそれらの態度について Whole virus vaccine と比べたものが図 5, 図 6, 図 7 で各株とも非常に良くこわれていて Whole virus vaccine と比べると 7 ~ 9 管ピークが軽い方に移動していることが解る。形態学的に電子顕微鏡でエーテル処理前, 後のものを写してみると図 8, 図 9, 図 10 のごとくエーテル処理後のものは HA スパイクがロゼットを形成して非常に良くこわれていることが解る。

(4) 試作ワクチンの安全試験について

安全試験については一般にモルモット, マウス等の腹腔内接種による体重減少, 発熱試験, 等が行なわれているので著者らも次の様に行った。モルモット及びマウスの腹腔

図 5

密度勾配遠心による沈降態度について

A/eq/Prague/l/56株

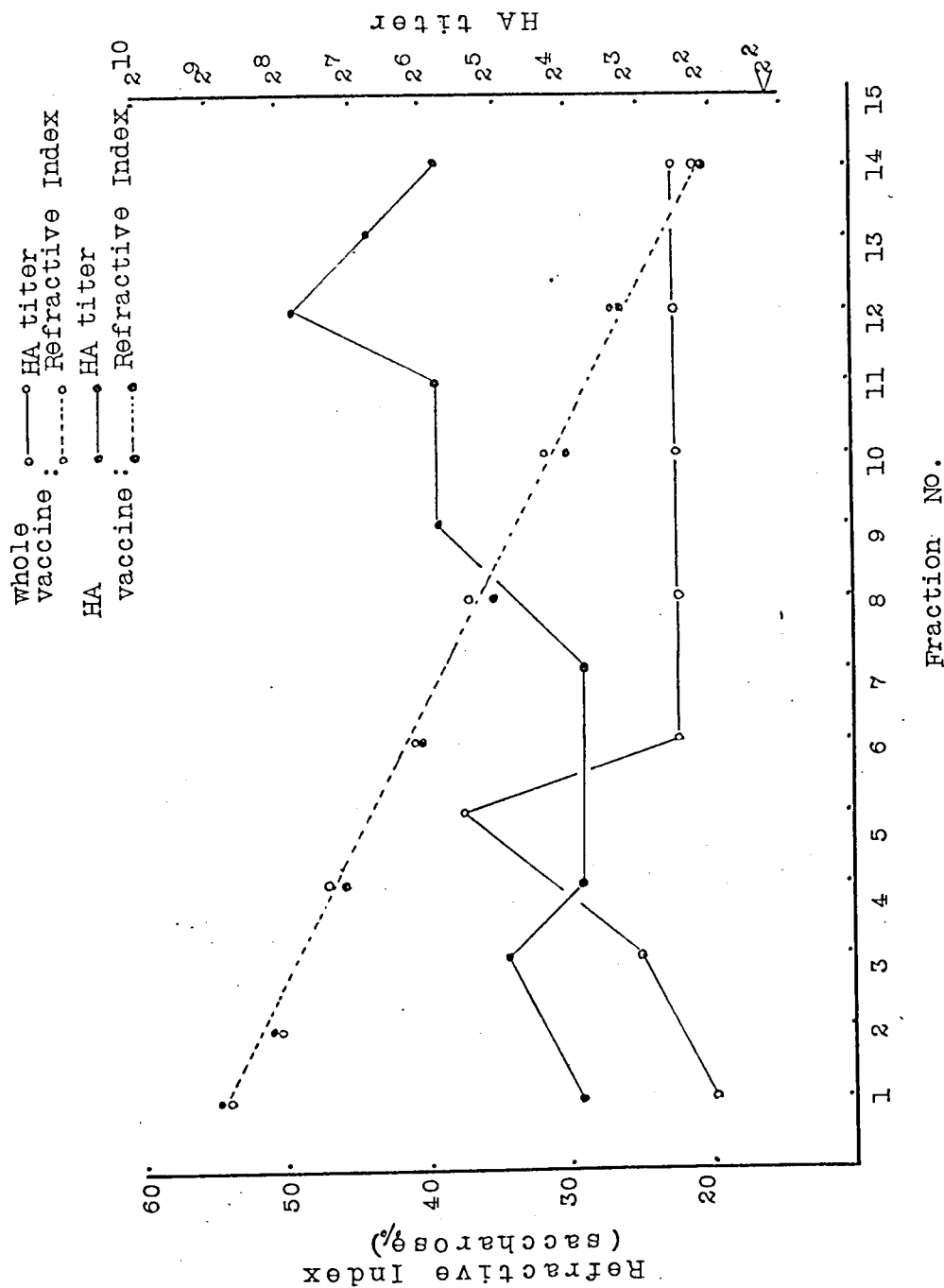
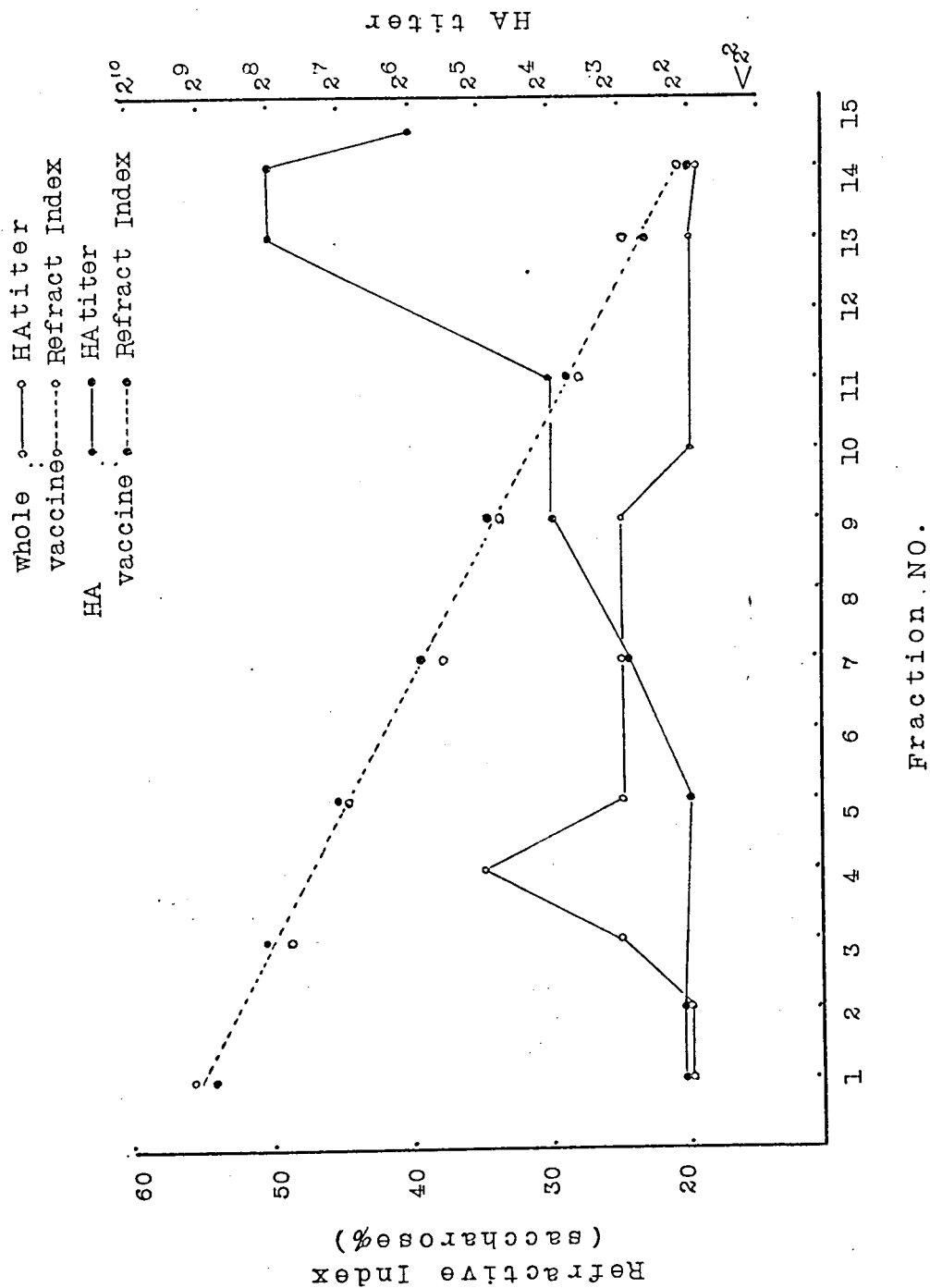


図 6

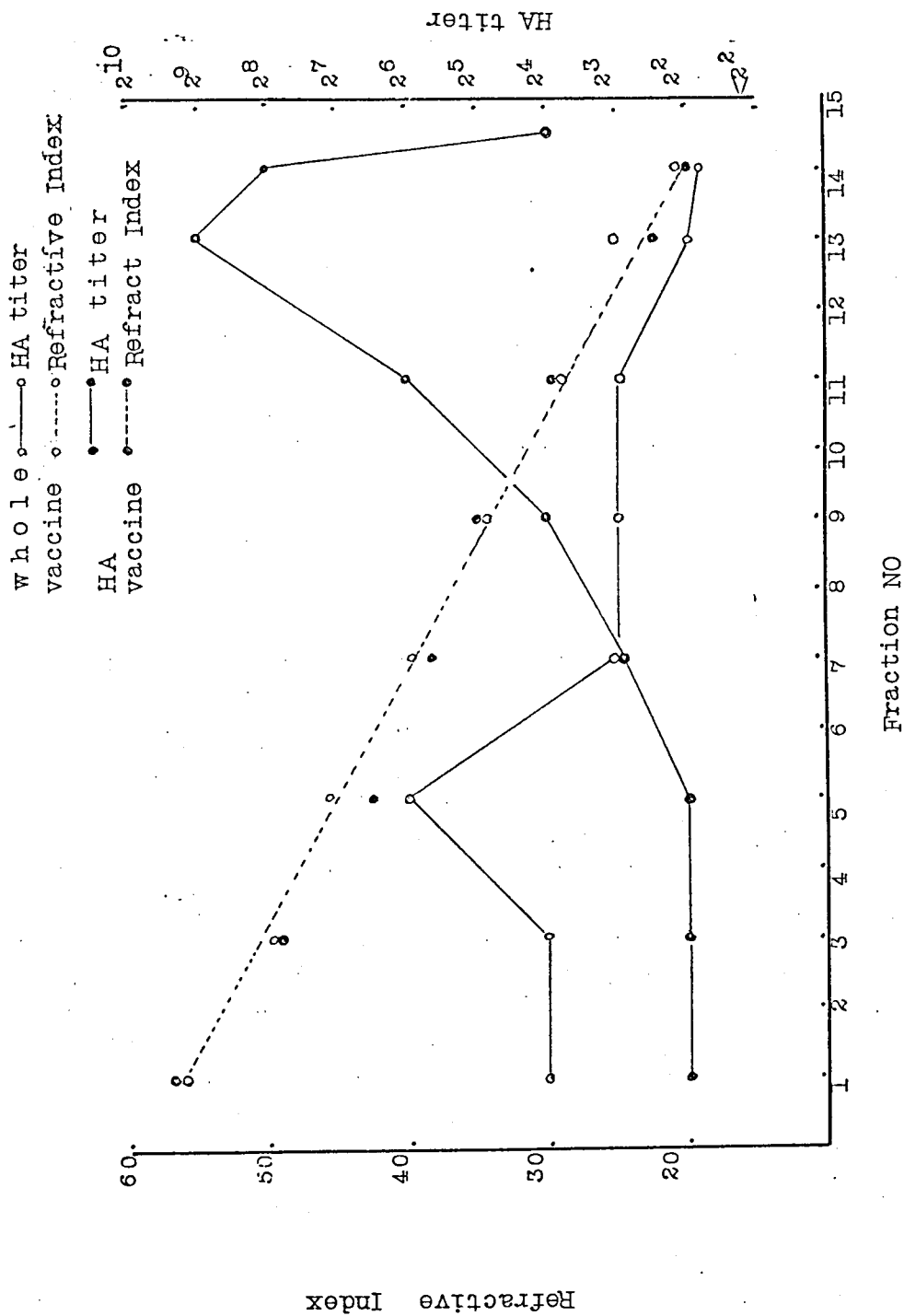
密度勾配遠心による沈降態度について

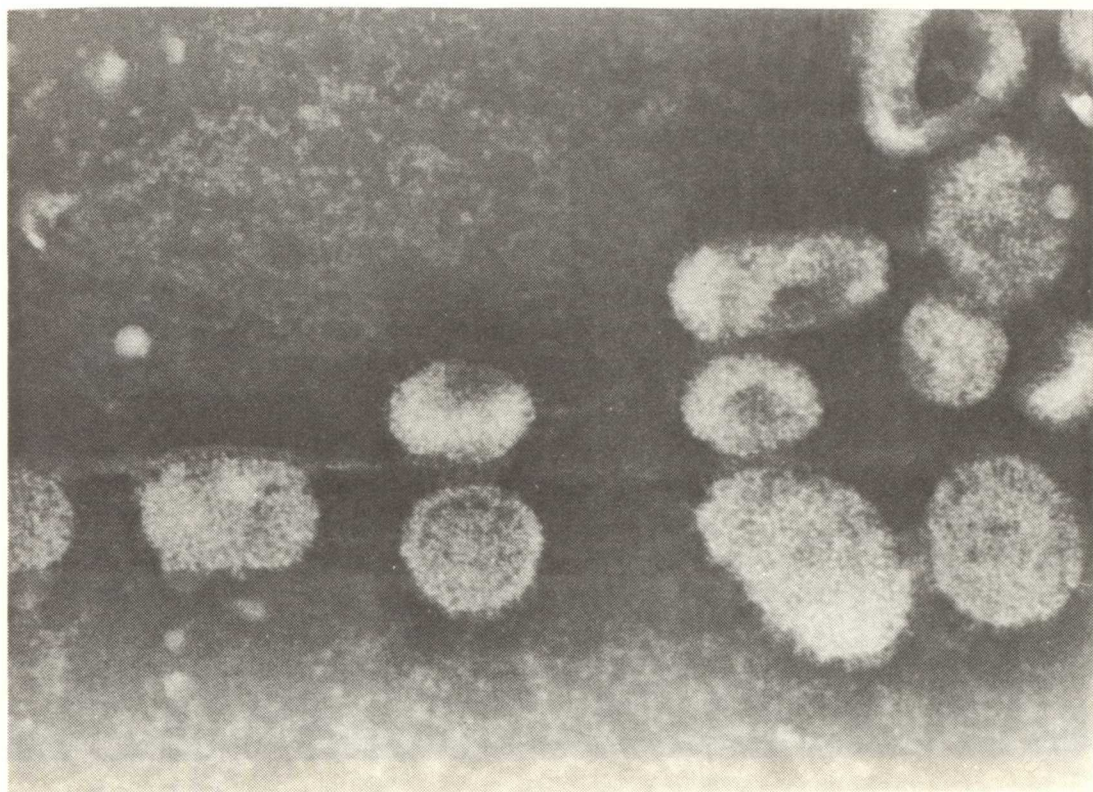
A / e q / Miami / 1 / 63 株



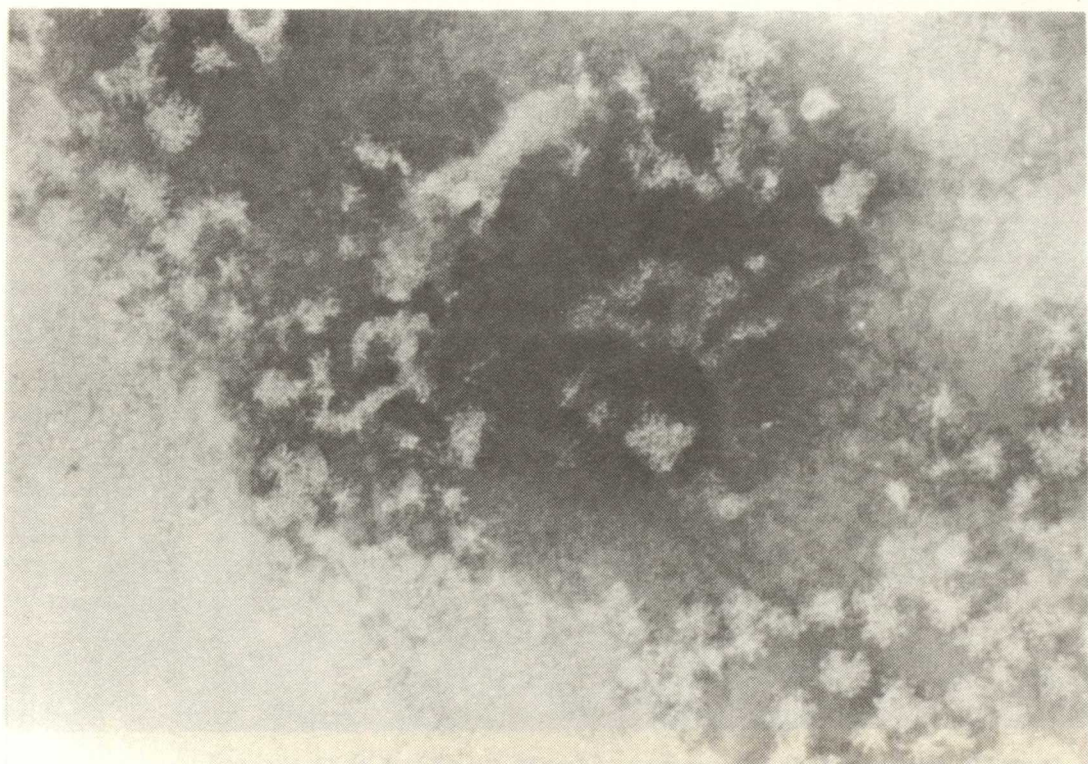
密度勾配遠心による沈降態度について

A1eq/chiba/3/71株

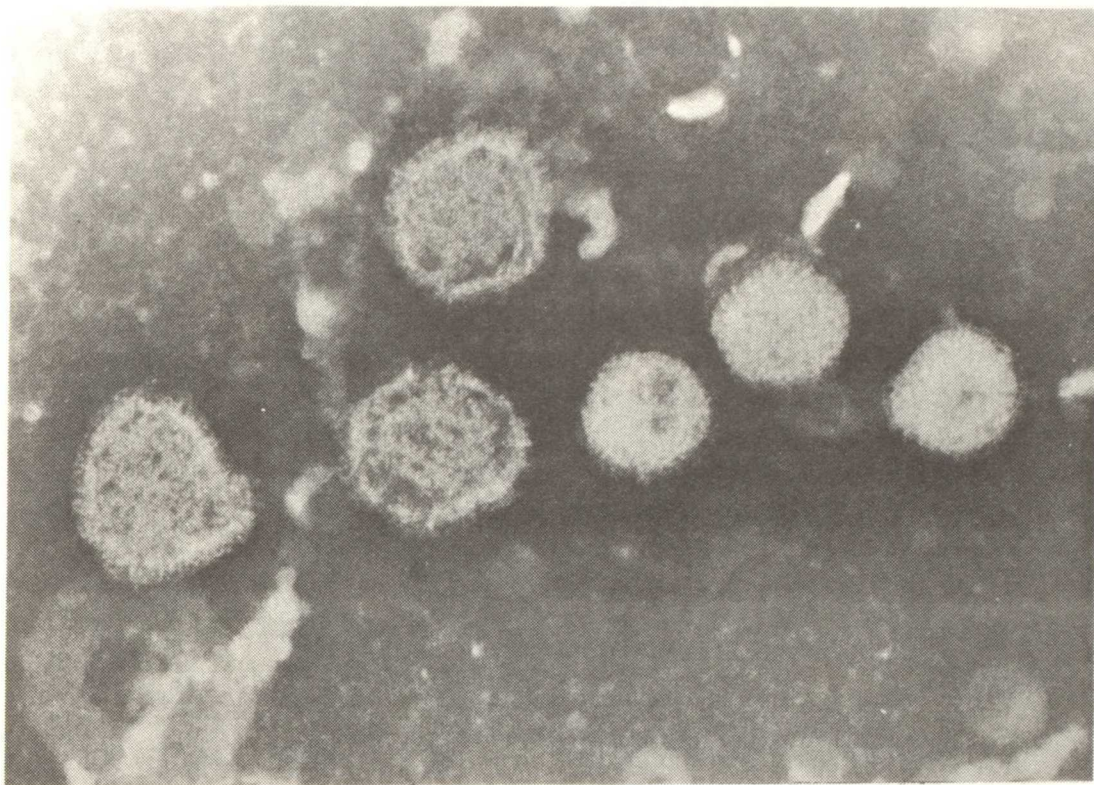




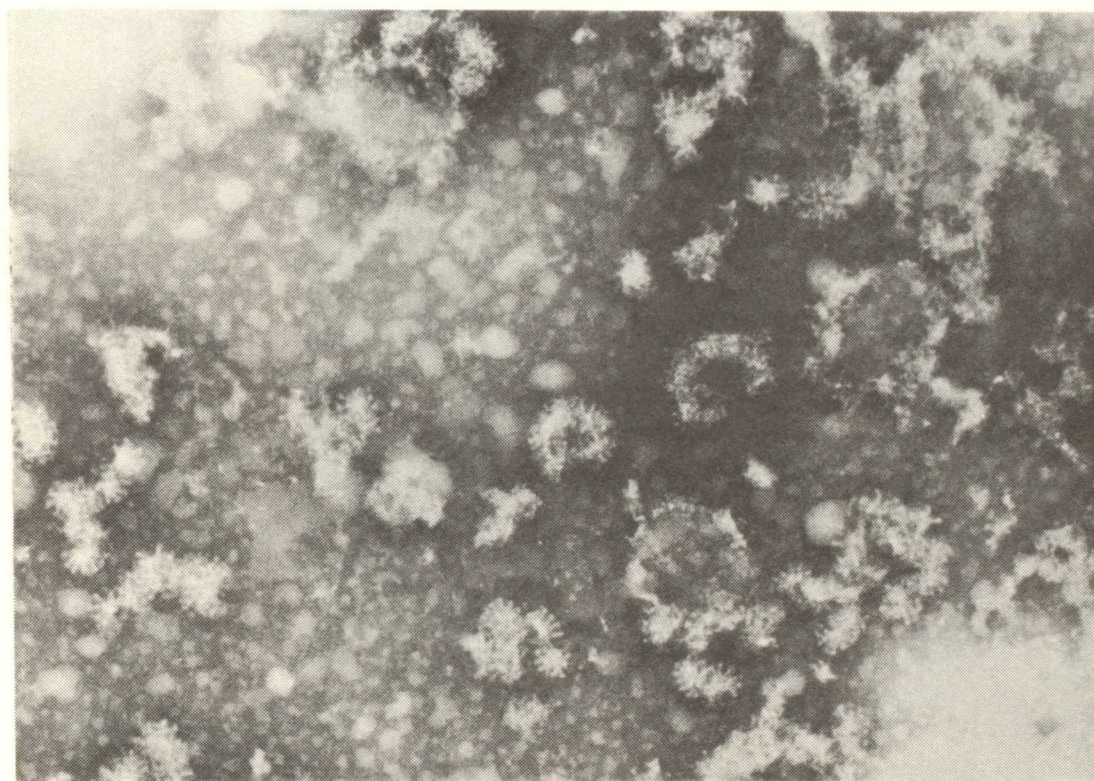
A/Equine/Prague/1/56 (Heq1.Neq1) Whole Virus x 160,000



A/Equine/Prague/1/56 (Heq1.Neq1) after Et₂O treated Virus x 160,000



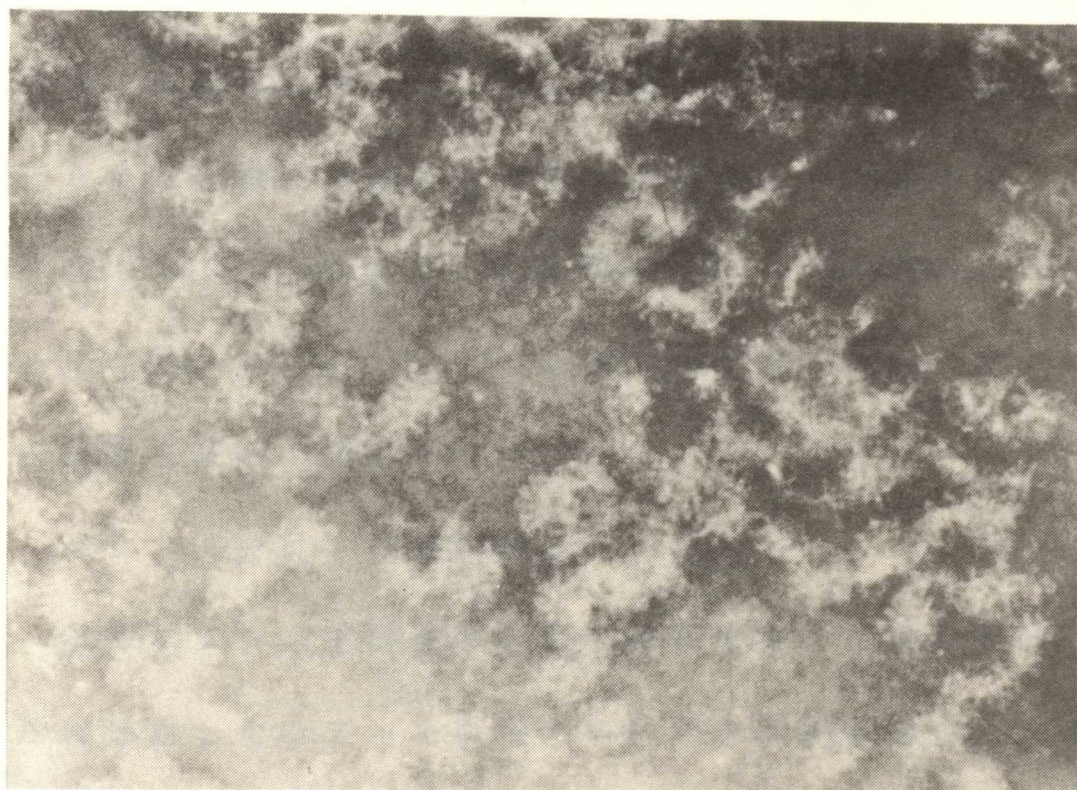
A/Equine/Miami/1/63 (Heq2.Neq2) Whole Virus x 160,000



A/Equine/Miami/1/63 (Heq2.Neq2) after Et₂O treated Virus x 160,000



A/Equine/Chiba/3/71 (Heq2.Neq2) Whole Virus x 160,000



A/Equine/Chiba/3/71 (Heq2.Neq2) after Et₂O treated Virus x 160,000

内に Whole virus vaccine と HA Vaccine を 5.0 ml/guinea pig, 0.5 ml/mouse ,宛接種して体重の変化を見たのが, 表 7 , 表 8 で接種 24 時間後モルモットでは Whole virus vaccine で平均 23.5 g , HA Vaccine で平均 5.5 g の体重減少を認めたが Whole virus vaccine では 4 日後に接種前の体重に復しその後は順調に上昇し, HA Vaccine では 2 日後に接種前の体重に復し以後は順調に体重は増加した。マウスに於ては順調に体重の増加を認め双方の差は認められなかった。

次に家兎を使用して発熱試験を行い安全試験の一助とした。尚試験方法については生物学的製剤基準⁴⁸を参照した。エーテル処理することによりウイルスの Lipid が除去されウイルス性発熱因子の激減することは内外諸学者の既知の事実であるが試作ワクチンの家兎に対する態度を調べると表 9 に示す様に接種直前の体温と接種後の最高体温の差を 3 匹の Total 発熱量で見ると Whole virus vaccine が 1.92°C に比べ HA Vaccine は 0.42°C と明らかな差が見られ Pyrogen の著明な減少が認められた。

(5) マウスに於ける力価試験について

試作ワクチンを前述の方法で希釈免疫して免疫期間 3 週後に採血しそのプール血清について中和試験を行った結果表 10 に示す様に Whole virus vaccine も HA Vaccine も同等

モルモット安全試験

Vaccine	モルモット体重													
	Date		1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	%	モルモット												
Whole Vaccine 各500cca total 1500 cca	1	44975	45600	4330	4350	4382	4592	4690	4724	4822	4901	4950	4992	
	2	38425	39800	3740	3820	3854	4023	4116	4126	4154	4172	4195	4212	
H A Vaccine 各500cca 相当 total1500 cca相当	1	41225	41800	4128	4260	4332	4440	4425	4455	4472	4500	4525	4592	
	2	42900	43320	4280	4472	4633	4852	4854	4902	4924	4992	5015	5042	

* i p 5.0 ml inoculation

マウスに於ける安全試験

ワクチン 種類	接種 種 量	マウス No.	マウス 体 重											
			1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Whole Vaccine 各500cca Total 1500cca	0.5 ^{ml}	1	19.25	20.75	21.00	22.00	22.50	23.50	24.25	24.75	25.25	25.90	26.25	
	"	2	20.35	21.00	22.75	24.20	25.25	26.25	26.50	28.00	28.25	28.75	29.25	30.00
	"	3	20.25	21.25	22.25	22.70	23.60	24.00	24.50	25.00	25.25	25.50	30.00	32.50
	"	4	19.50	20.75	21.90	22.25	23.40	24.00	24.10	24.90	25.25	25.25	25.75	35.21
	"	5	20.75	21.00	22.25	23.75	24.75	25.25	26.00	25.90	26.52	27.25	28.00	28.50
H A Vaccine 各500cca Total 1500cca 相当	0.5 ^{ml}	1	20.0	20.50	21.75	22.60	22.75	23.75	24.25	25.25	26.00	26.25	27.25	
	"	2	20.75	21.25	22.00	22.40	23.50	24.00	24.25	25.00	25.00	25.75	25.90	26.25
	"	3	19.75	21.00	21.25	21.75	22.25	23.50	23.75	24.25	24.50	24.75	25.25	26.00
	"	4	20.0	20.50	21.50	22.25	23.60	24.75	24.75	25.25	25.25	25.75	26.00	26.75
	"	5	20.95	21.20	21.90	22.50	23.20	23.50	23.60	24.75	24.90	25.75	25.90	26.50

* i p inoculation

ウサギに於ける発熱試験

ワクチン	ウサギ №	注射量 / 体重	対 照 体 温					接 種 直 前	接 種 後 体 温								
			前 150分	前 120分	前 90分	前 60分	前 30分		後 30分	後 60分	後 90分	後 120分	後 150分	後 180分	後 240分	後 300分	後 360分
Whole Virus Vaccine 各500cca total 1500cca	1	21/ 21	38.70	38.85	38.92	38.95	39.10	39.20	39.23	39.20	39.84	39.25	39.30	39.28	39.25	39.27	39.24
	2	212/ 212	38.78	38.78	38.78	38.80	38.88	38.90	38.90	39.00	38.95	39.06	39.32	39.15	39.10	39.00	39.08
	3	220/ 220	39.30	39.20	39.28	39.25	39.22	39.30	39.70	40.15	40.20	40.08	40.05	39.90	39.75	39.80	39.50
HA Vaccine 各500cca 相当 total 1500cca 相当	1	218/ 218	38.80	38.80	38.78	38.85	38.88	38.98	39.10	39.15	39.26	39.12	39.08	39.05	39.04	39.02	39.03
	2	192/ 192	39.00	38.90	39.15	39.20	39.22	39.40	39.42	39.35	39.40	39.34	39.25	39.14	39.16	39.20	39.17
	3	226/ 226	38.56	38.80	38.62	38.60	38.70	38.78	38.86	38.93	38.92	39.00	39.00	38.98	38.98	39.00	38.82

注射ウイルス量 300cca、300cca相当量のウイルスを 1ml / kg iv

表 1 0

マウスによる馬インフルエンザ力価試験

Challenge Virus Vaccine	A/eq/prague/1/56	A/eq/Miami/1/63	A/eq/Chiba/3/71
Whole Vaccine	$5^{6.5}$	$5^{5.5}$	$5^{6.0}$
H A Vaccine	$5^{6.25}$	$5^{5.5}$	$5^{6.5}$
Challenge Virus	$10^{2.7}$	$10^{3.5}$	$10^{2.9}$

Log 5 ED₅₀

に抗体上昇し双方共ほとんど差のない力価を示している。

(6) ワクチン保存試験

試作ワクチンの保存による経時的変化について各保存期間の試作ワクチンを10倍に希釈してマウスの腹腔内に0.5 ml 宛接種，免疫期間3週後の血清でHI試験を行ったが図11で試作Whole virus vaccine，HA Vaccineとも経時的に全く変化なく，この期間は4°Cに保存するかぎり抗原として全く変化ないものであることが解った。

3. 試作ワクチンの野外成績

(1) 野外馬に於ける安全試験

当才馬10頭，3才馬10頭について頸側皮下に1.0 ml，Whole virus vaccine，HA Vaccineを接種し安全性を調べたのが図12で発熱は朝，夕，測定を行い，全身症状及び局所の反応として腫張の観察を行ったが全く異常は認められなかった。

(2) 抗体産生及び抗体の推移について

Whole virus vaccine と HA Vaccine の抗体産生及び抗体の推移について11週間に亘り追跡した。

a) 1回接種群のHI及びNT抗体の推移について，図13，

図14に示す様にWhole，HA VaccineともHIは1週間で抗体上昇が見られ2～3週がピークとなり，4週以降，下

図 1 1

ワクチンの保存試験

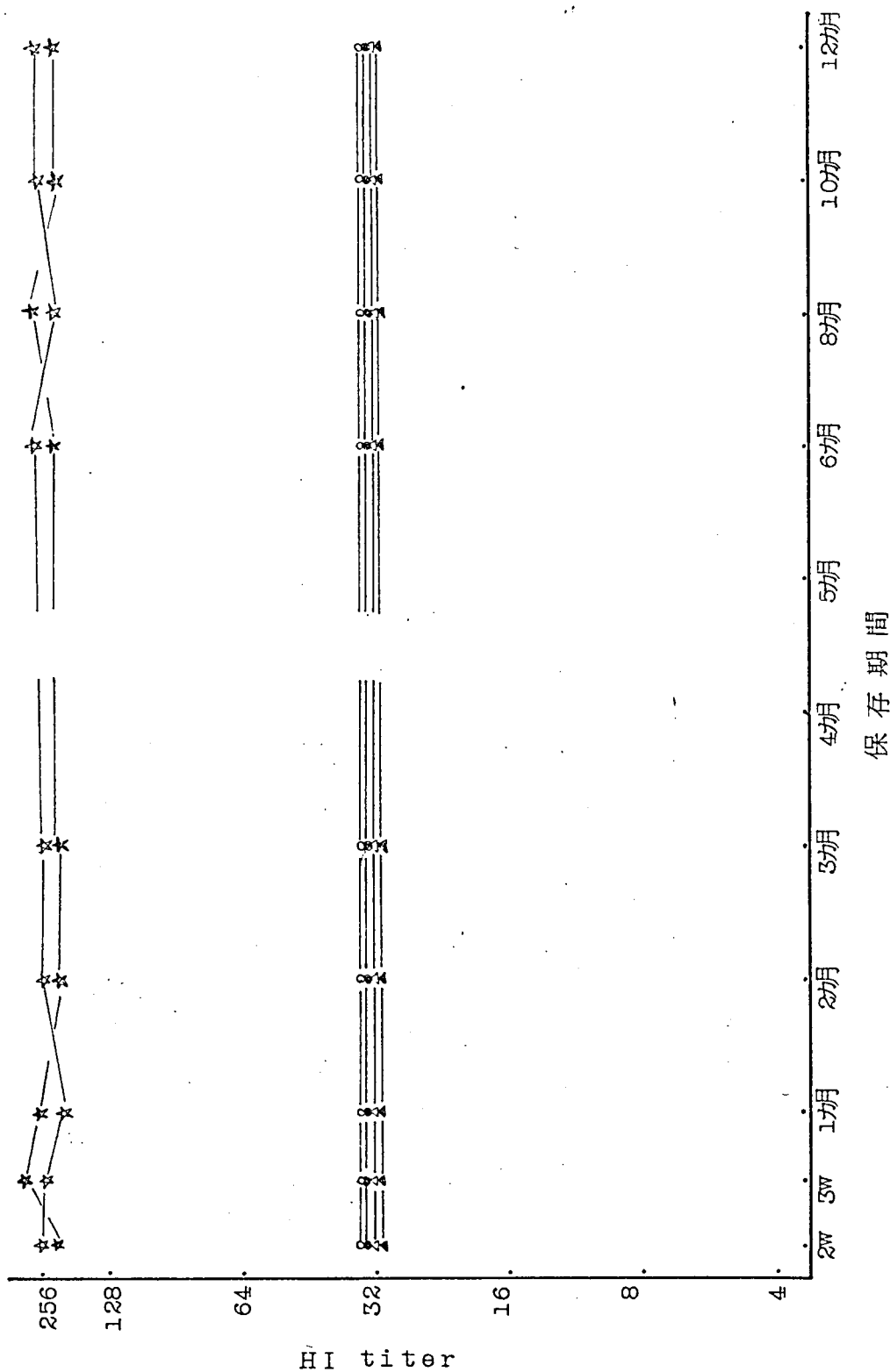
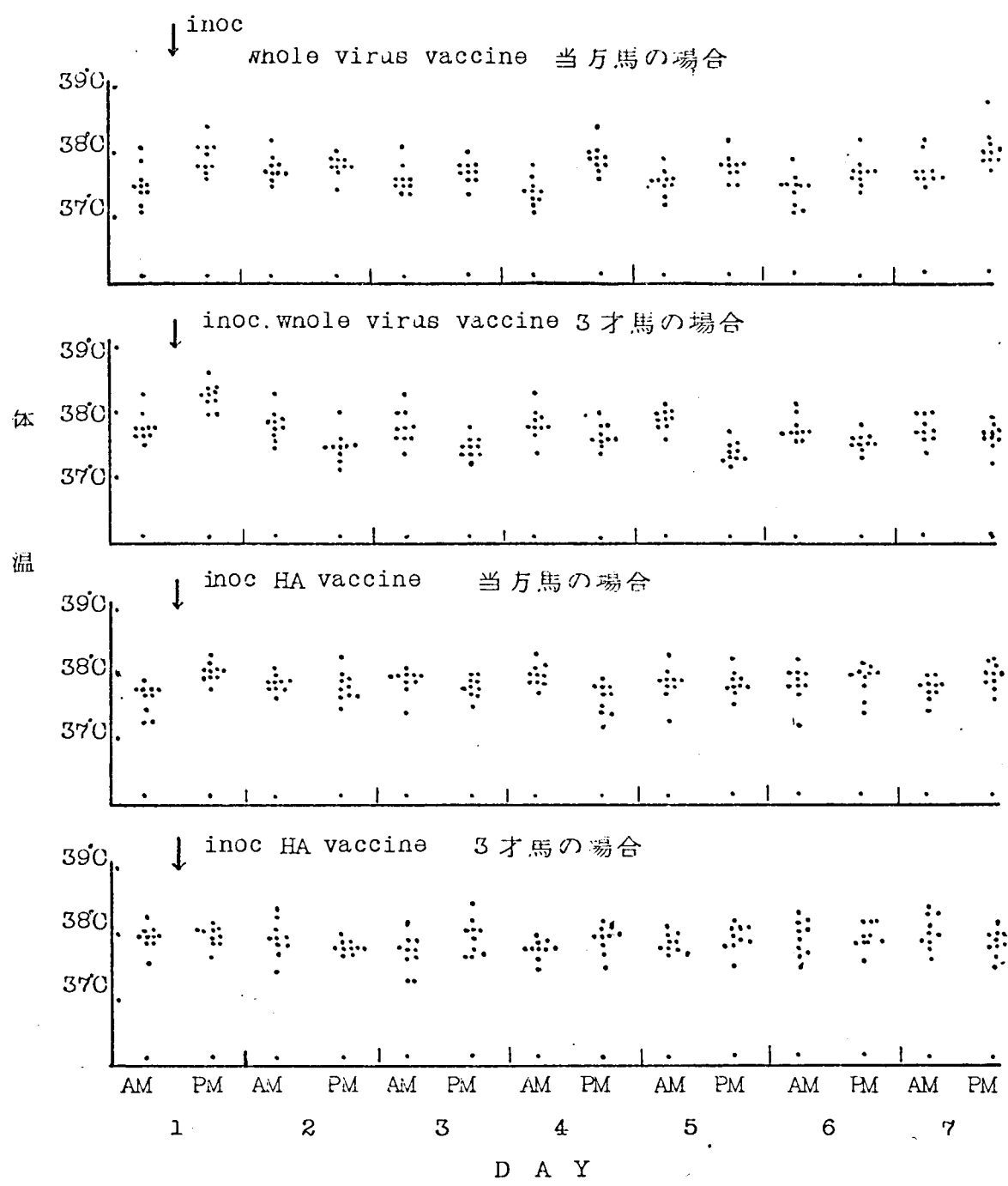


図 1 2

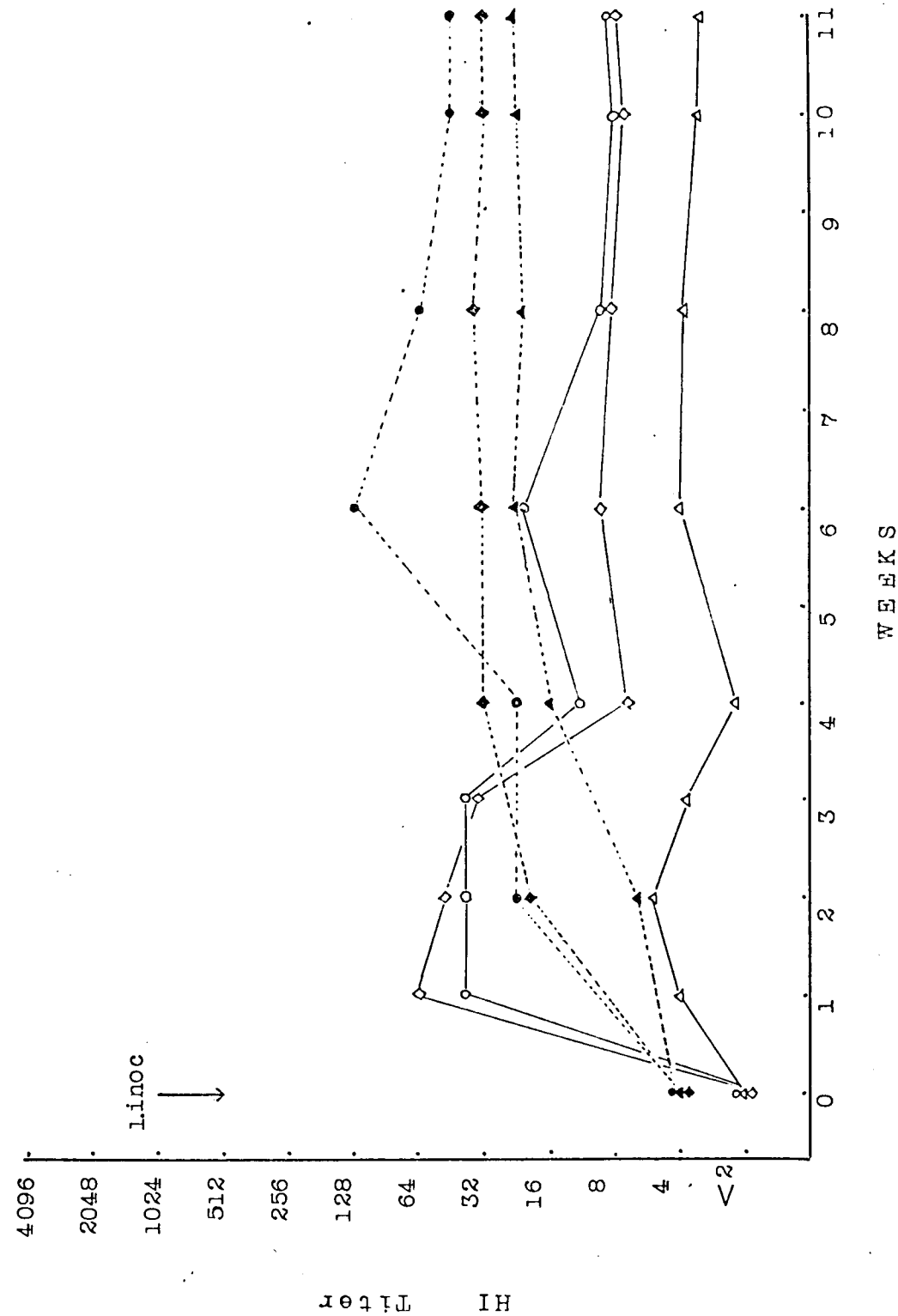
馬のワクチン接種による体温の変動



頸側皮下1.0 ml接種
AM:午前9時
PM:午後5時測定

whole vaccine 1 回 接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1500cca)

HI NT
 ○ — prague
 △ — Miami
 ◇ — Chiba



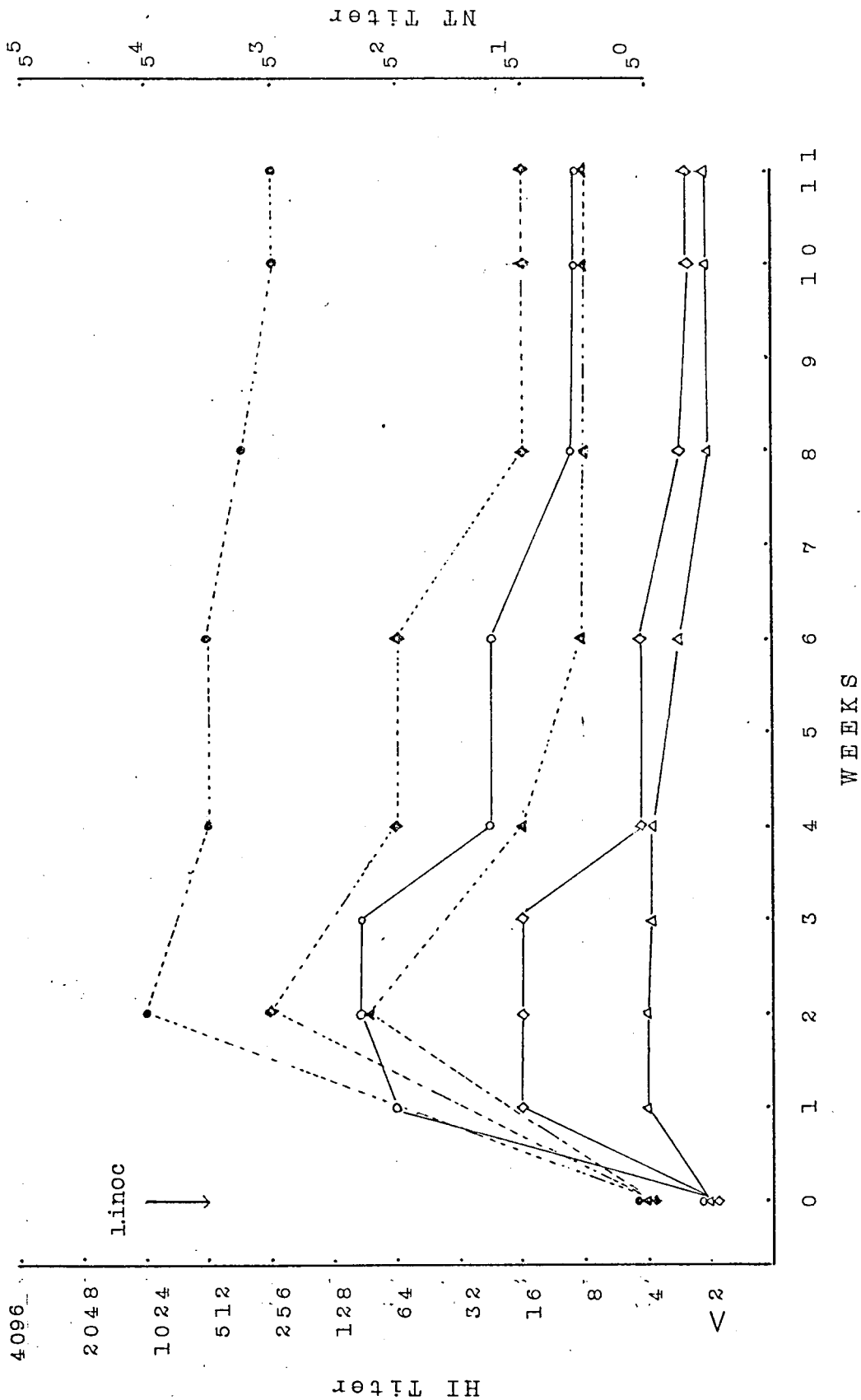
HA Vaccine 1 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1500 cca 相当)

HI NT

○ — Prague ● — ●

△ — Miami — △

◇ — Chiba — ◇



降する傾向にあり， NT は双方共， 2 ～ 3 週がピークで Whole はほとんど低下せず 11 週まで続き， HA に於ては 4 週で下降し 11 週の時点では Whole の方が高い値を示していた。

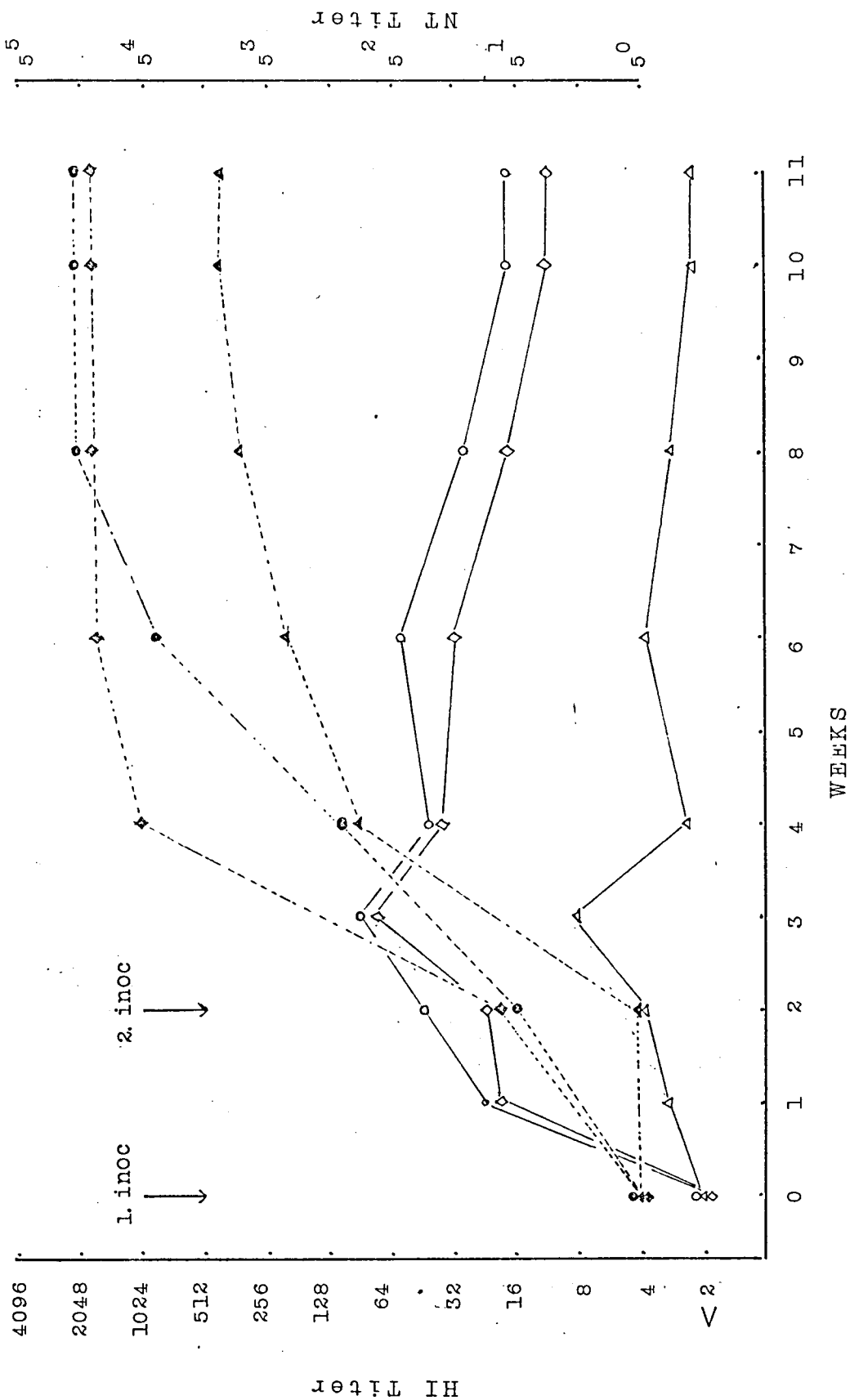
b) 2 週間隔 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移について
図 15， 図 16 に示す様に Whole， HA Vaccine とも HI は 2 回接種後 1 週でピークに達し 2 回接種後 2 週間で下降し始めゆるやかな低下を示している。 Whole， HA Vaccine とも Miami 株の抗体上昇持続が低い様である。 NT は Whole HA Vaccine とも 6 週間まで上昇をたどり 11 週まで低下せず持続している。

c) 4 週間隔 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移について
図 17， 図 18 に示す様に Whole， HA Vaccine とも HI は 2 回接種後 2 週目にピークに達し， Whole vaccine はほとんど変化なく 11 週まで続き， HA は下降の傾向にあるが 11 週の HI 価は双方ともほとんど変らない。 NT に於ては HI 同様 2 回接種後 2 週でピークに達しほとんど低下せず 11 週まで持続している。

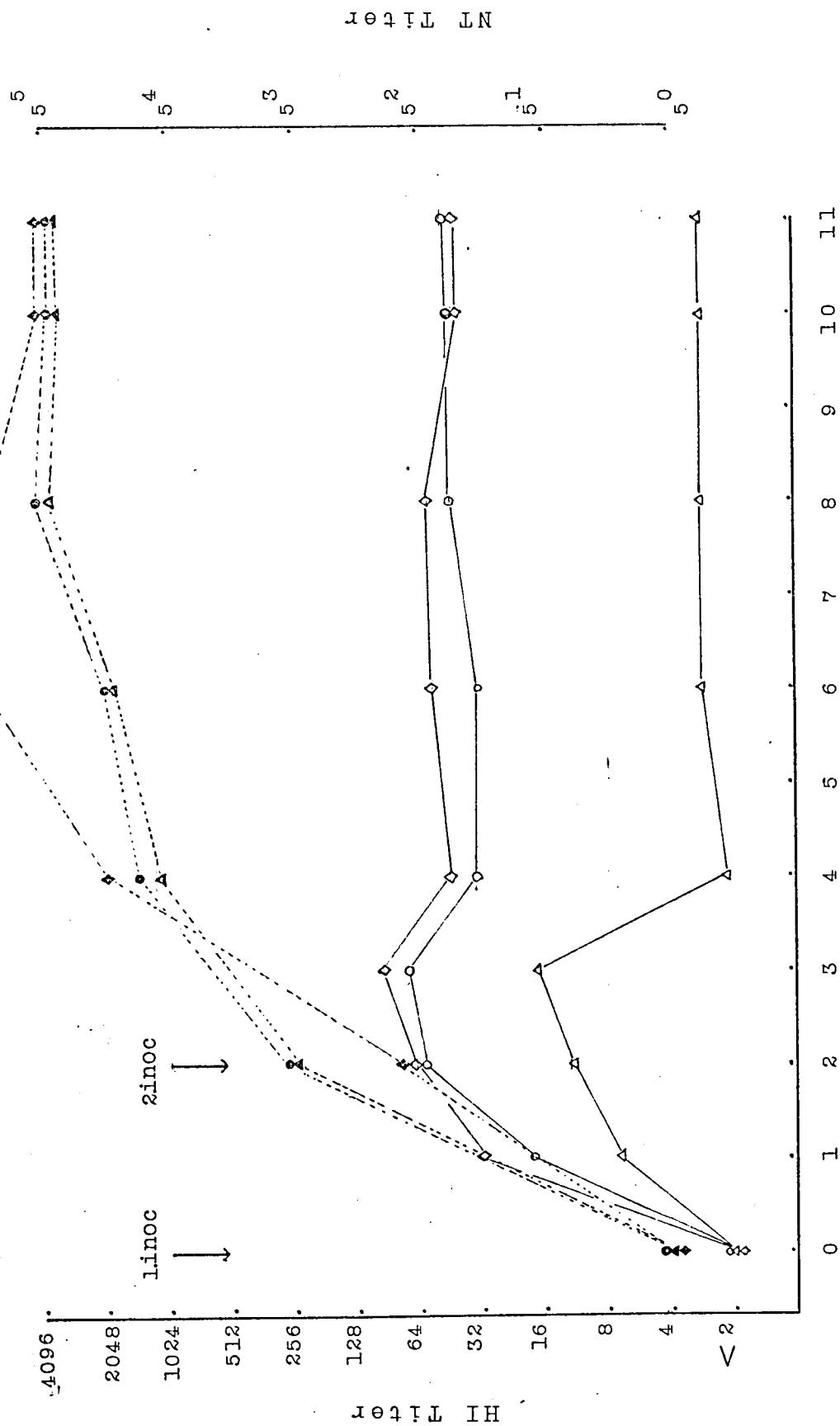
d) 2 週間隔 3 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移について
図 19， 図 20 に示す様に Whole， HA Vaccine とも HI は 3 回接種後 2 週間目がピークで 3 週間目位から少し下降

Whole Vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1) (1500ccA)

HI NT
 ○-prague ---●
 △-Miami ---▲
 ◇-Chiba ---◇



HA Vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1) (1500 cca 相当)



Whole Vaccine 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (2) (1500 CCA 相当)

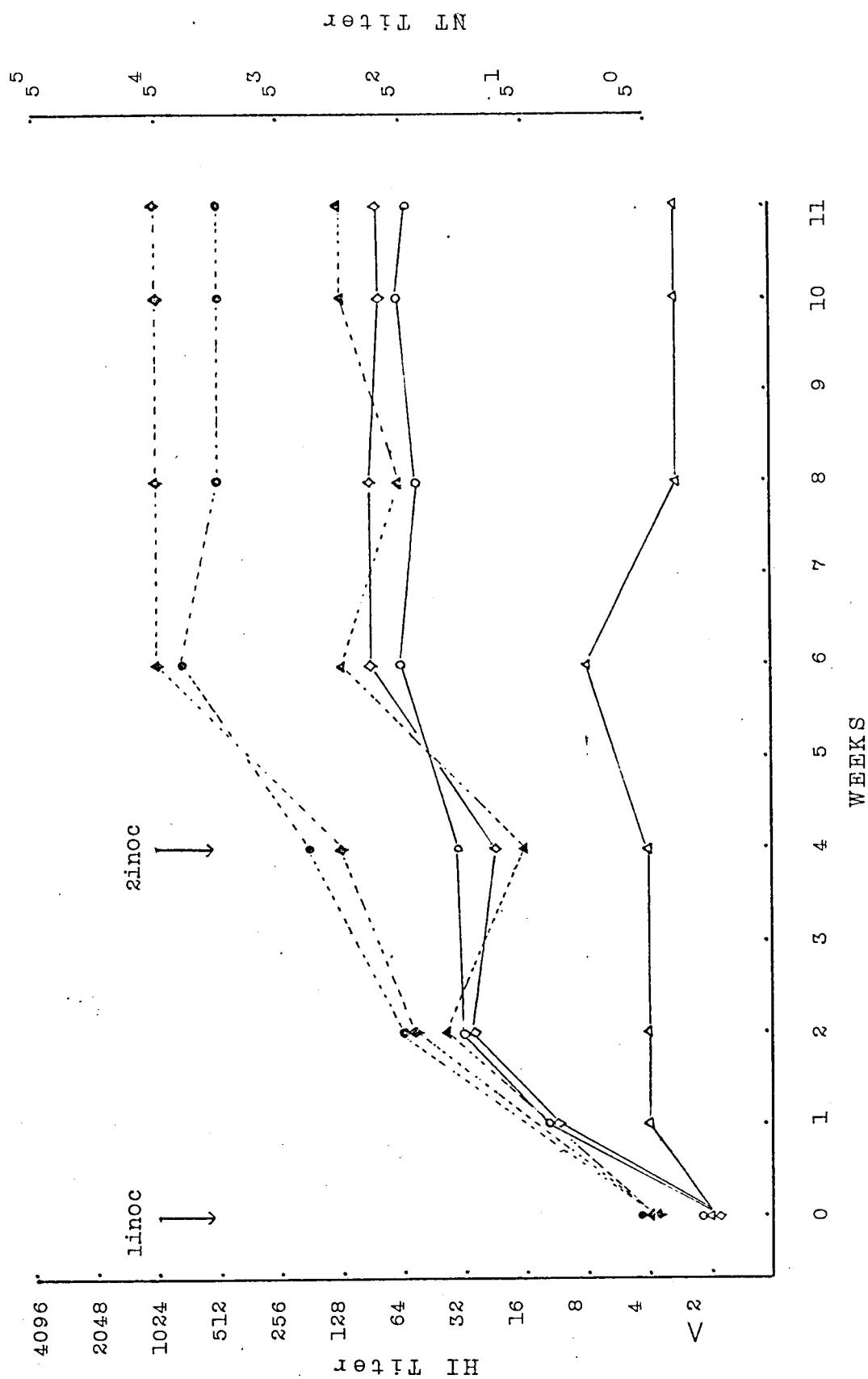
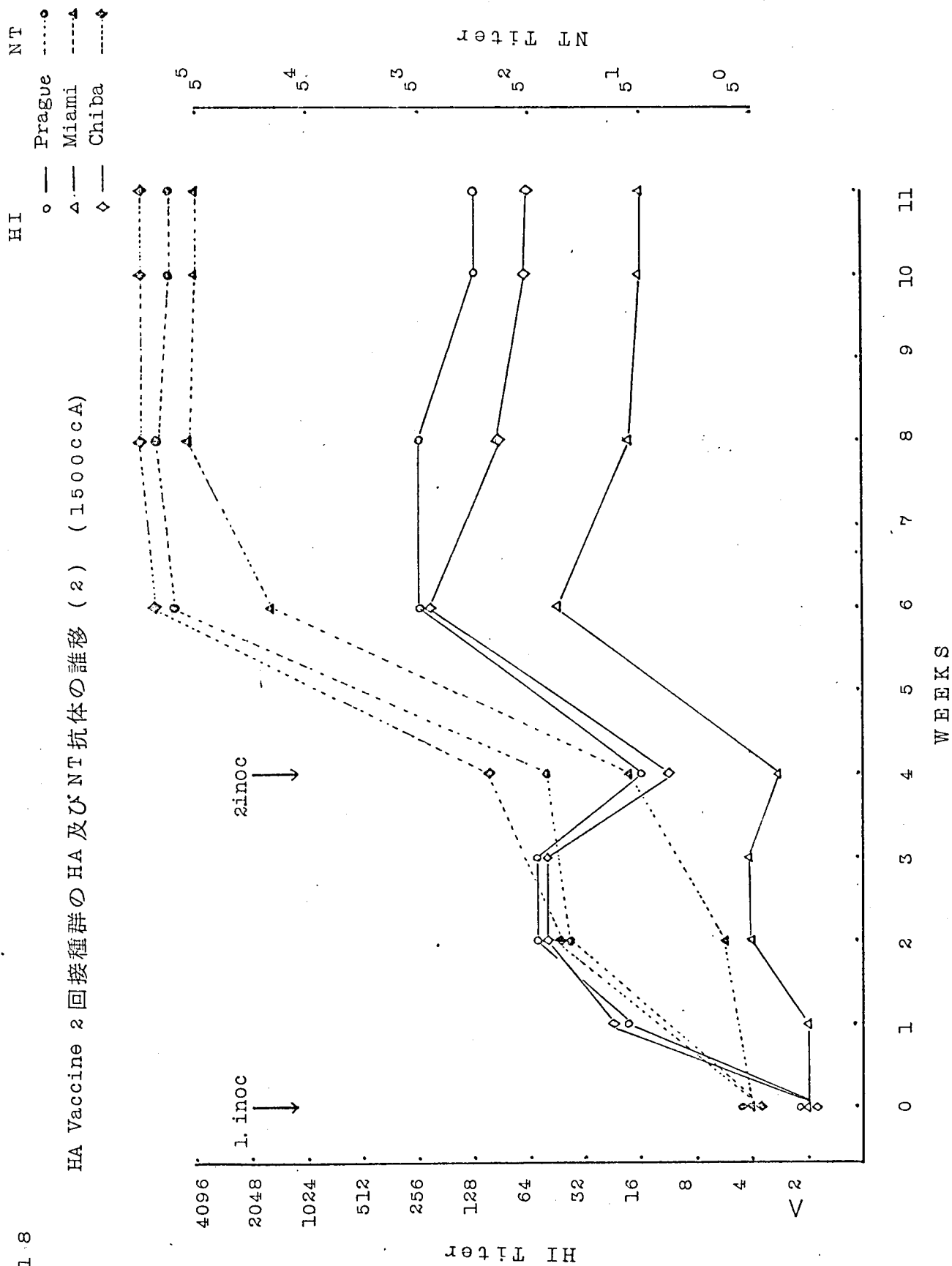


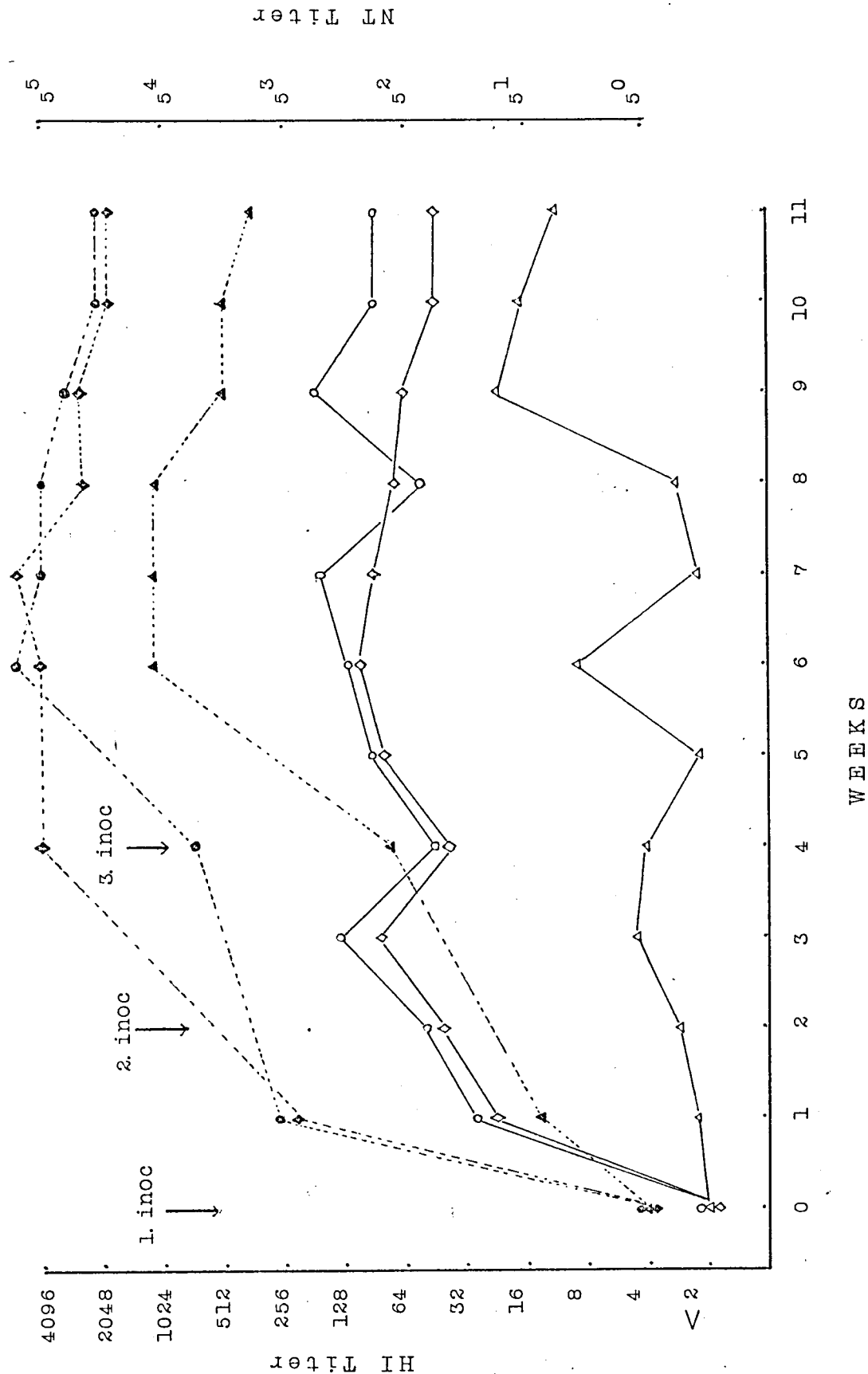
図 18



whole vaccine 3 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1500 cca)

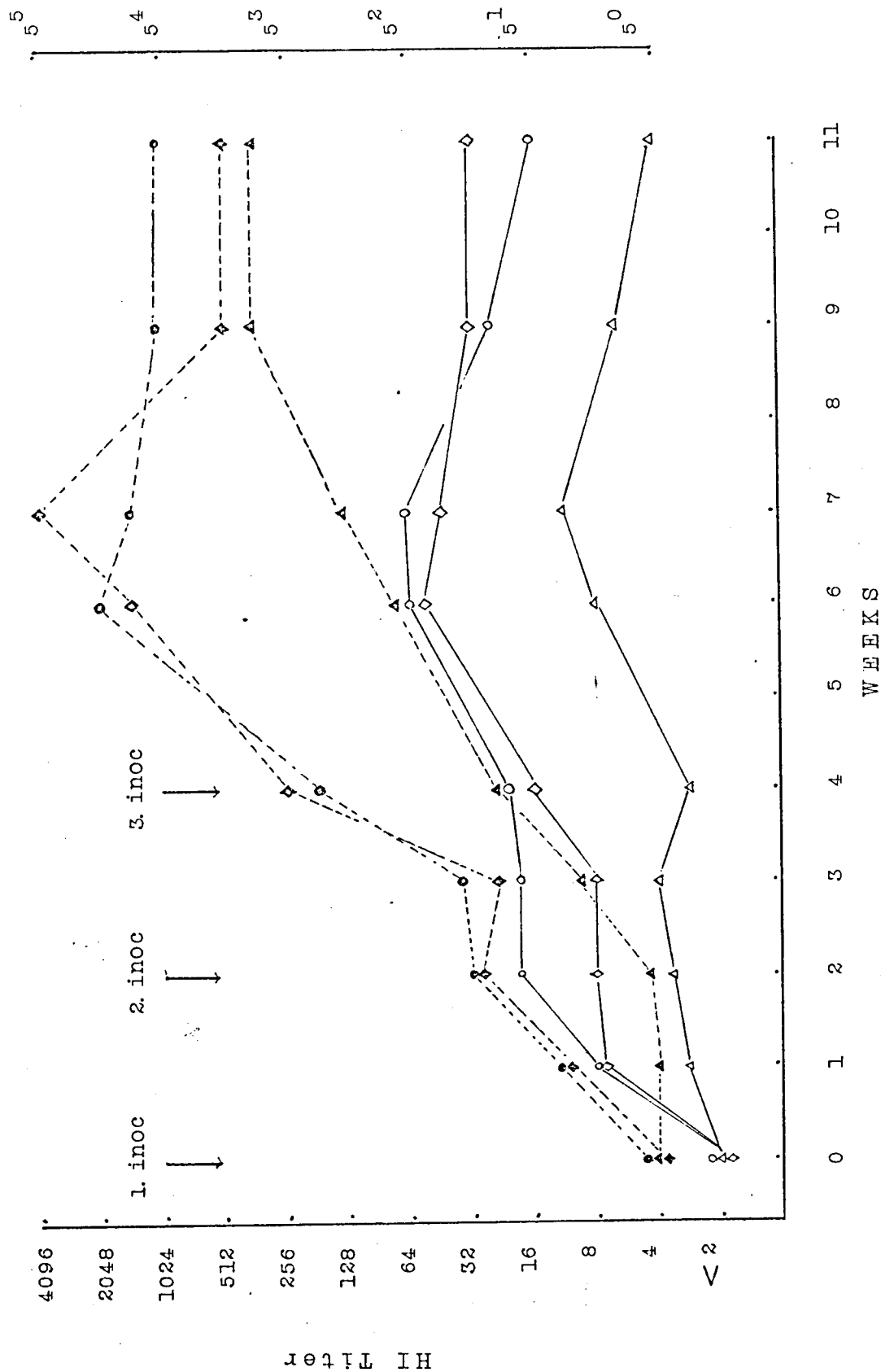
HI
 ○ — prague
 △ — Miami
 ◇ — Chiba

NT
 ● — prague
 ▲ — Miami
 ◆ — Chiba



HA vaccines 3 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1500 cca 相当)

HI
 ○ — prague
 △ — Miami
 ◇ — Chiba
 NT
 ○
 △
 ◇



する傾向にあり NT に於ても同様に思われた。

e) 自然感染馬 2 週間隔 2 回接種群の HI 及び NT 抗体の推移について自然感染回復後 2 ヶ月目の回復馬に接種すると図 21 , 図 22 の如く HI , NT とも非常に良く抗体上昇を示しほとんど 1 回接種でピークに達し 2 回目接種しても HI , NT 抗体の上昇は認められなかった。

(3) 抗体持続の補強免疫について

HA Vaccine 4 週間隔 2 回接種群の抗体上昇が良かったのでそのグループより 4 頭の馬を使って追加免疫を 6 ヶ月 , 1 年目に各 2 頭ずつ行ったところ図 23 に示す様な成績を得た。尚抗体持続については 6 ヶ月目で Prague , Chiba 株で 16 倍 , Miami 株で 4 倍の HI 価を示し 1 年后 Prague , Chiba 株で 8 倍 , Miami 株で 4 倍の HI 価を示した。

図 2 1

自然感染馬 Whole Vaccine 2回接種群の HI 及び NT 抗体の推移 (1500 cca)

HI NT

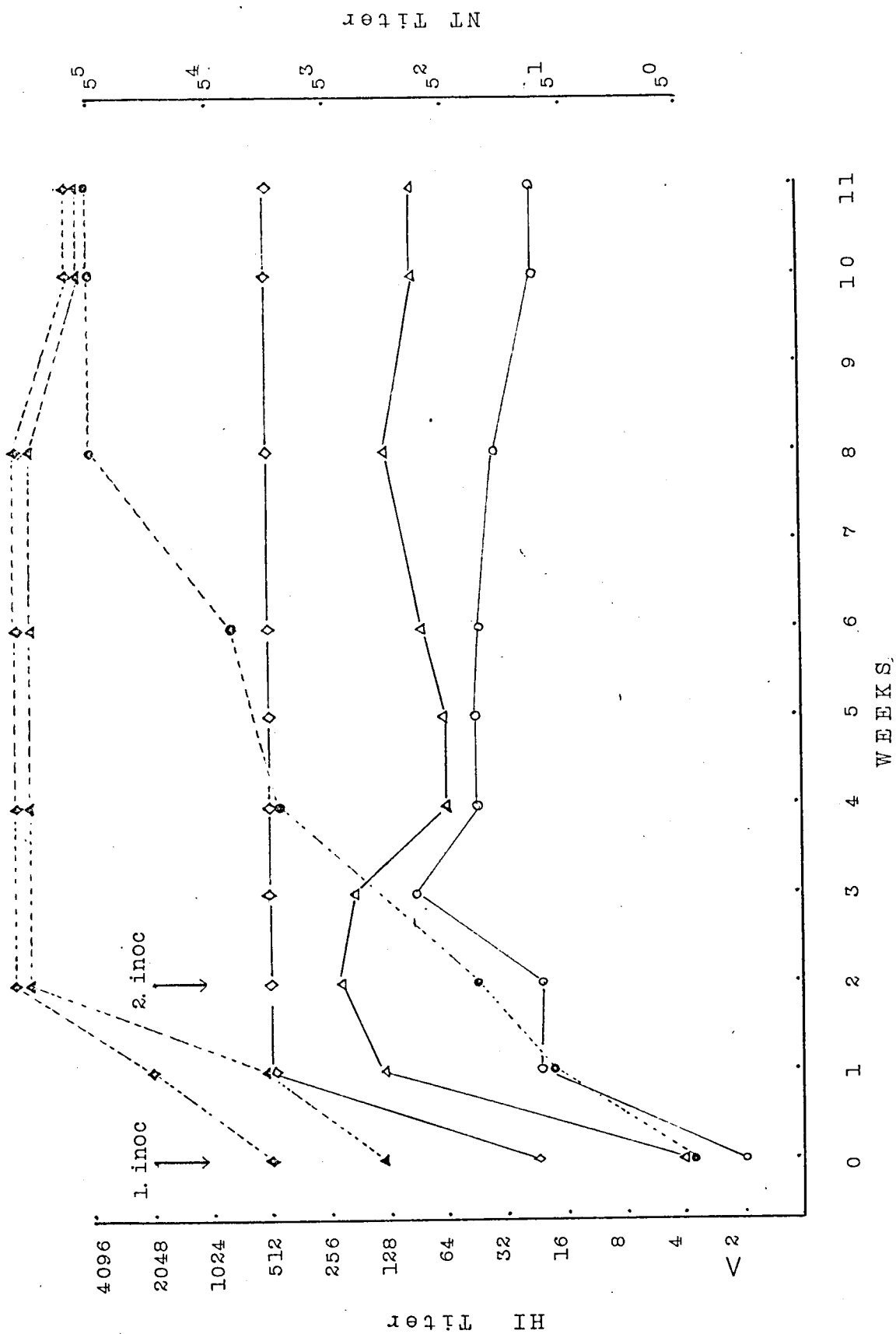
○ — Prague

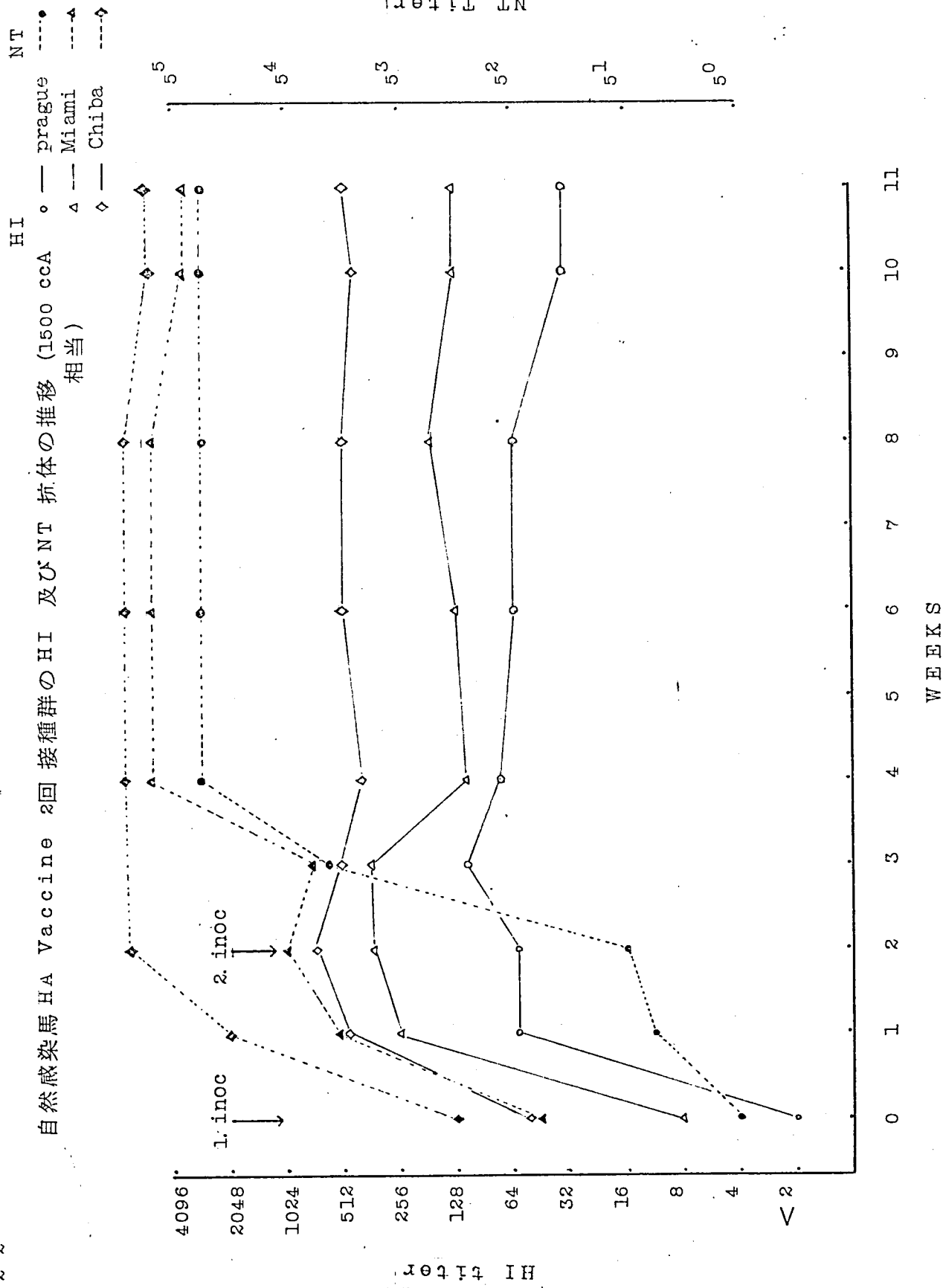
△ — Miami

◇ — Chiba

● — NT

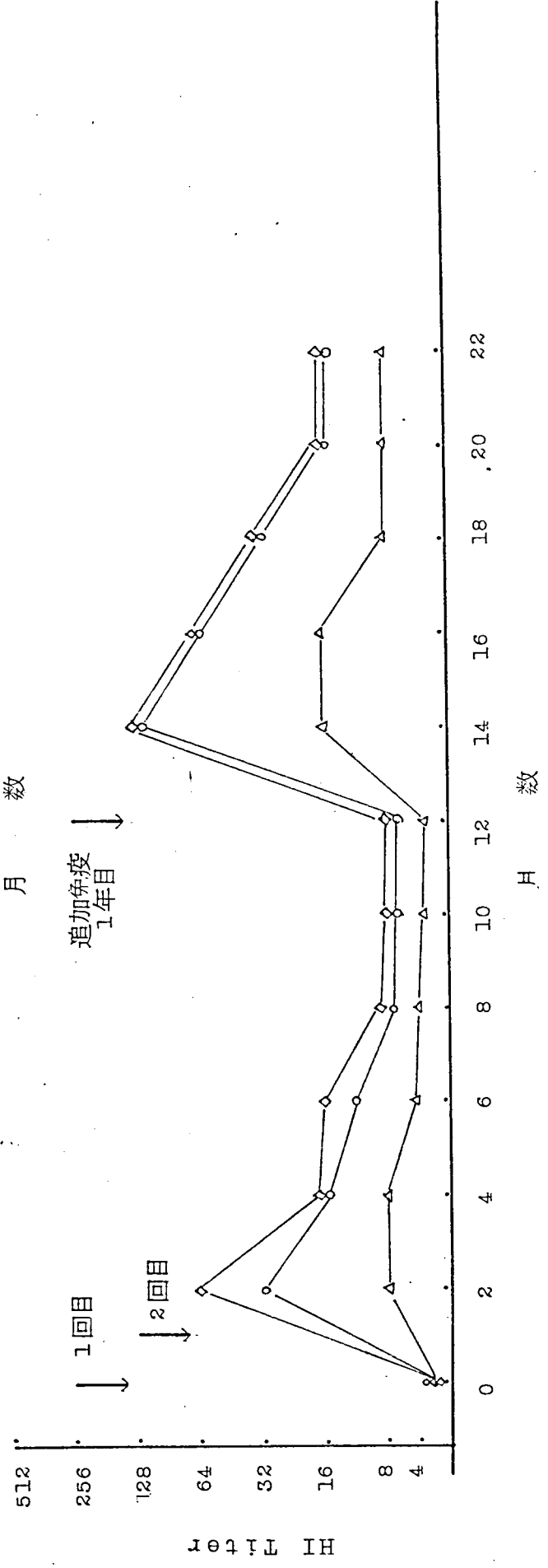
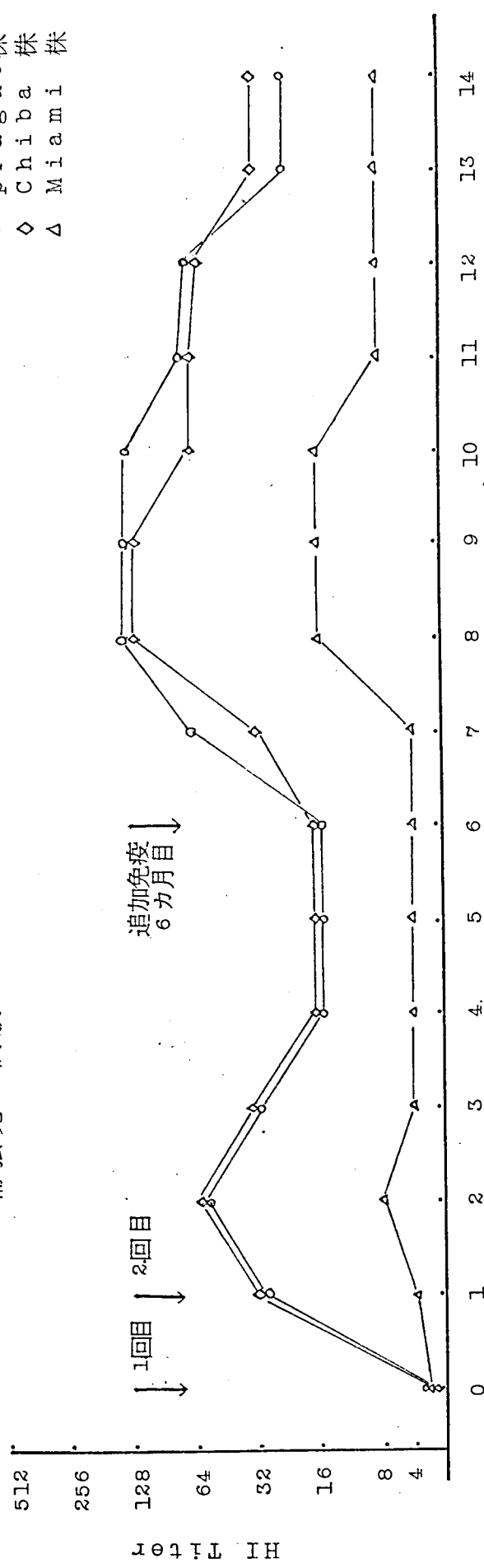
— — NT





補強免疫試験

○ prague 株
◇ Chiba 株
△ Miami 株



考 察

臨床的に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罹患馬の急性期，回復期の対血清で行ったHI試験，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，Chiba 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なかったと思われる。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中に抗体を保有するものが抗体価は非常に低いが一部認められた。今回著者らが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て急性期は抗体が全然認められないが回復期の血清に於ては明らかな抗体上昇が認められ感染馬全頭に抗体上昇が証明された。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。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態度等から明らかに差があり，分離 Chiba 株はⅡ型の変異を起したものであると思われる。そこで著者らはこの抗原的に多少異っている変異株 A/Eq/Chiba/3/71 (Heq 2, Neq 2)

と標準株である A/Eq/Prague/1/56 (Heq 1, Neq 1), A/Eq/Miami/1/63 (Heq 2, Neq 2) 株を使用して 3 株混合ワクチンの試作を行なった。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。しかしながらこれらのウイルスも非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はなくてほとんどは今まで存在してい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^④らによる報告で良く知られていることである。1964 年 Davenport^⑤らの報告によると Influenza Intact Swine Virus 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后得た Swine HA で免疫すると FM 1, PR 8, A₂/AA/23/57 株にも反応する抗体が産生されたと云う。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ものか等と考えられ HA にした方が抗原性の幅が広くな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家兎に注射すると Pyrogen が出る。インフルエンザウイルスの発熱因子は virus 粒子そのものと考えたのは 1949 年 Bernett^{②,③,④}らが最初にみつけウイルス粒子のニワトリ赤血球吸着、遊出の各段階を調べ発熱原性がウイルスと同じく移行することにより明らかにした。赤血球凝集素が残

る程度に加熱して感染性を失わせたウイルスにも発熱性はあるし又加熱その他により赤血球より溶出しなくなった状態のウイルスがなお発熱性であることからシアリダーゼと発熱因子との関連性は否定された。又紫外線照射，ホルマリン処理では血球凝集性が低下しないにもかかわらず発熱性が減退することから単なる赤血球凝集素ともこの発熱因子は異っている^⑧。それに感染性のない不完全ウイルス粒子にも発熱原性はある^⑨。ウイルスをエーテル処理することにより単離されるS抗原，HA及びLipid分画には発熱原性がないし更に再びそれらのものを混合しても処理前の様な発熱原性は復元出来ない^{⑩, ⑪}。以上のように発熱因子の本質については今のところ全く不明である。一方エーテル処理后得られた赤血球凝集抗原は赤血球凝集抑制抗体（HI抗体），や中和抗体（NT抗体）を蛋白量が同じであればWhole virusと同様に産生し得る^⑫。赤血球凝集抗原はマウス胎児接種でも毒性がない^⑬。赤血球凝集抗原の免疫で得られる抗体の中和能はWhole virusで得られたものと差がない^⑭。この様な結果はいずれもWhole virusワクチンよりもHAワクチンの方が望ましいと云う成績であるが動物実験の成績で人で確められたものでなかった。その理由は人に用いるだけきれいなワクチンを大量得られなかったことによるもので1961年，水谷^⑮らが酢酸ランタンを用いることによりエーテル処理后赤血球凝集抗原を分離する方法を

見つけ、1964年 Davenport ら¹⁸⁾はこの方法で作った人体用HAワクチンの野外実験で子供に接種した場合も従来のワクチンに比べると発熱反応が明らかに少なく、赤血球凝集抑制抗体(HI抗体)や中和抗体(NT抗体)は同様に産生される等の結果を報告して以来HAワクチンの開発が進められて来た。^{5), 6), 7), 16), 17), 18), 20), 21), 22), 23), 24)}すなわちウイルス粒子をこわし副作用を起す部分を除くか、破壊し、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步としてHAワクチンが開発されて来た。著者もこの様なことで馬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発熱誘発物質を除去することにより抗原量を多くすることが可能となり予防効果の面でも従来のワクチンより優れたものが出来ると考え応用した。著者の行った結果、ウサギに対する発熱量はWhole virusワクチンで 1.96°C 、HAワクチンで 0.58°C となり、HAワクチンに於てはほとんど自然動揺範囲であり、発熱性の明らかな減少が認められた。モルモット及びマウスに於ける安全試験の結果に於ても体重の減少はWhole virusワクチンで4日、HAワクチンで2日で接種前の体重に復し、その後は順調に増加し、明らかな差を示した。マウスに於てはあまり明らかな差はなかったが接種量が少ないせいと思われた。尚抗原性についてはマウス力価試験の成績よりWhole virusワクチンとHAワクチンではほとんど

差がないと思われたし Davenport^⑩ が Swine 株で行なった様な detergent でこわすことによる抗原性の幅の広がりとは認められなかった。又ワクチンの保存性について経時的にマウスに接種して 4°C に於ける抗原の変化について 1 年間追跡した結果、4°C ではマウスに対する免疫力は変化せず安定した結果を得た。

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、マウス等の結果と同様な態度を示したが、ウサギに於ける発熱で Whole virus ワクチンと HA ワクチンと明らかな差が認められたものが野外の場合には差が認められなかった。これは接種量に問題があると思われる。又副反応として局所の硬結、腫張、等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。Evans^⑪, Triaux^⑫ によると Whole virus ワクチンを 150 ~ 250 CCA/ml, 0.5 ml 接種に於て無菌的な腫張等が出現したと報告している。著者らの野外試験に於てはそれらの無菌的腫張等認められなかった。又 Shechmeister^⑬ らの報告によると少数例ではあるがわずか 1 : 320 HA 価のワクチン接種で腫張が認められ又 alginate adjuvant ワクチンに於ては 2 回接種後に 2 ~ 15 cm 直径の Sponge Swellings を認めているし、Pressler^⑭ らは aluminium oxide に A I, A II 型ウイルスを吸着させることにより免疫持続を長びかせているが、腫張、赤発の出現を認めている。Longlois^⑮, DeMeio^⑯, Wilson^⑰

Cottureau^⑩らは alminium hydroxide, sodium alginate等の adjuvant を使用して 4 週間隔 2 回接種で 80～100%, 抗体上昇を認めているが副反応として硬結, 赤発, 等の出現を指摘している。彼らは副反応よりも抗体上昇持続に重点をおいてウイルス量をあまり多くしないで抗体産生を促す方法として adjuvant を考えている。この点著者らのワクチンは adjuvant を添加しないで抗原量を 4～5 倍量多く含みその上副作用の少ないワクチンである。又 Bryans^{⑩,⑪}, Woodhour,^⑩らによると Light mineral oil, Peanut oil を含んだ adjuvant 65 を使用したワクチンを接種すると granuloma の出現を認めたと云うことを報告し, Triau^⑩らは卵を使用して作られたワクチンはウイルスの増殖の際に卵の成分が組み込まれてそれらのものによって反応が引き起されることを報告している。著者らのワクチンも卵を使用して作っているが Triau^⑩らの云う反応を(卵に対するアレルギー等の局所反応)感知することは出来なかった。Evans^⑩らの報告によると Oily adjuvant ワクチンによる副反応はサラブレット系に接種した場合, 接種後 24～48 時間後に 60～80% が発熱する場合が多く, 他の乗馬に於ては少し低い% で出現する。又ワクチン接種の 10% は接種部位の疼痛を伴い機能障害を起し, 再接種后(2 週, 1 ヶ月, 1 年后)接種局所に浮腫を起すものが認められ或は再接種后 2～5 週後に肉芽腫の出現等が認められたと報

告している。又その他、接種部位例えば筋肉内、皮下、等の接種部位によって異ってくるが、実験室内動物と比べても必ずしも馬と一致しない。例えば Frerichs らによるとウマ、ニワトリ、ウサギ、モルモット、マウス等にワクチネーションを行い比較すると馬には浮腫の出現があったものがこれらの動物に於ては出現しないし抗体上昇についてもニワトリ、モルモット、マウスの抗体上昇は良いが他の動物はそれらに比べて低い等の点がある。ワクチンの副作用について述べているものには adjuvant 剤を使用しているものがかなりあり、adjuvant 剤の使用の適、不適についてはかなりの問題があるが諸外国に於ては adjuvant を抗体持続、上昇、等と云う意味で広く多く使用されている^{⑪,⑫,⑬,⑭,⑮,⑯,⑰,⑱,⑲,⑳,㉑,㉒,㉓,㉔,㉕,㉖,㉗,㉘,㉙,㉚,㉛,㉜,㉝,㉞,㉟}。著者らのワクチンはこれらの副反応の問題から adjuvant 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、又副反応を軽減し、抗体上昇をさせると云う点で一応満足すべき結果を得た。馬と実験動物に対するワクチンの抗体上昇については著者らは馬とマウスについて調べたが、マウスに於ては Whole virus ワクチン、HA ワクチン双方共同じ免疫応答が得られたが馬に於てはマウスの場合と免疫方法の違いから比較出来なかった。Frerichs^{⑫,⑬}、Stellman^⑭、Mayr^⑮らは実験動物と馬に対する抗体について調べているが、これらも接種ワクチンの種類、接種方法等によって差が生じて来るがマウスよりもモ

ルモットの抗体産生が良い様に思われた。唯モルモットを大量に免疫してそれらの血清の平均価を調べることは経済的な点から大変でその点ではマウスの方が利用度は高いと思われる。

Stellman^⑨、らも種々の動物で比較して統計的処理によりマウスの有用性をのべている。著者らは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, とも抗体上昇はどの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。Brander^⑧らは単味でワクチネーションを行い4週間隔2回接種で12～14週間抗体の持続を見ている。Powell^⑩らの報告によると接種間隔について, 初回接種后4～6週后にBoosterを接種したグループが一番抗体上昇持続とも良かったと述べているがこれらは著者らの実験と一致する。又Burki^⑪らはBooster後の再接種について種々の実験を行って6ヶ月後に再接種する方法が抗体持続に良いと述べている。又Lucam^⑫らはBooster後の再接種は初回接種より1年后に行うのが適当であると報告している。抗体の持続についてPressler^⑬, らは2 ml ずつ60日, 360日, 420日後に接種すると3年間抗体持続があると云う報告もあり, 著者らは6ヶ月, 1年后に追加免疫を行い抗体を調べたところ抗体上昇, 持続が良かった。現在局所抗体の感染防御に及ぼす効果等について種々検討されて

来ているが^{④,⑬,⑭,⑮,⑯,⑰}これらについては今後の問題であろう。
実際 Bryans^⑩ら Rose^⑫らによると HI Titer で 1 : 20 以上で、
Nasal section Neutralizing antibody で 5 倍以上の抗体の存在下
で馬に 10^8 EID₅₀ のウイルスを challenge すると耐過する成績を
報告している。著者らの試作ワクチンは馬の野外試験に於ても
安全性が確認され、Whole virus ワクチンと同様、又はそれ以
上の免疫を賦与するすぐれたワクチンであると考えられる。

結 論

馬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、次の様な結論を
得た。

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 株とも交差 HI 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 HI 試験、中和試験により解った。

2. ワクチンの作製

新分離株と既知の株とでは抗原的にひらきがあるので AI

型 A/Eq/Prague/1/56 (Heq 1 . Neq 1) 株 , A II 型 A/Eq/Miami/1/63 (Heq 2 . Neq 2) 株 , 分離株 A/Eq/Chiba/3/71 (Heq 2 . Neq 2) 株 の 3 株 混合ワクチン (それぞれ 500 CCA , 500 CCA 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 80 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 わかった

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 vaccine と HA vaccine 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 vaccine で 平均 23.5 gr , HA vaccine で 5.5gr の 体重減少 を 示し , HA vaccine 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 vaccine では 4 日 , HA vaccine では 2 日 と HA vaccine 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 vaccine が 1.92°C で HA vaccine は 0.42°C と Whole virus vaccine に 比べ $\frac{1}{5}$ 程度 の 発熱 であり , HA vaccine の 0.42°C の 発熱 は

ウサギの自然動揺とも見られ HA vaccine の発熱はないと同様に思われた。野外に於てこれらの vaccine を当才馬 10 頭， 3 才馬 10 頭，につき接種副反応を調べたところほとんど発熱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。接種間隔で一番良いと思われたのは 4 週間隔 2 回接種で 6 ヶ月， 1 年后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°C 12 ヶ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 vaccine と比較し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に保存期間も長く良好な免疫力を賦与する優れたワクチンであることが証明された。

謝 辞

稿を終るに当り，本研究の機会を与え下さった北里研究所，
所長，水之江公英博士，ならびに終始御懇篤な御教示と御校閲
の労を賜った北里研究所部長，斉藤保二博士に深甚の謝意を捧
げます。またこの研究を挙行するに当り御指導を賜った北里研
究所部長，五十嵐義晃博士に心より謝意を表わすと共に終始御
協力，御援助下さった研究室各位に衷心より感謝の意を表しま
す。

参 考 文 献

- 1) Akiyama, Y., T. Kumanomido, K. Hirasawa, Y. Okuda, E. Tabuchi, (1972)
: Studies on outbreak of equine influenza in Japan in 1971.
--Conditions of outbreak and investigation of hemagglutination
inhibition antibody--
Exp. Rep. Equine Hlth Lab. No.9 10-28
- 2) Atkins, E., Hung, W.C., (1958)
: Studies on the pathogenesis of fever with influenza viruses.
3. The relation of tolerance to the production of Endogenous pyrogen.
J. Exp. Med., 107 415-435
- 3) Bernett, I.L., Wagner, R.R., Lequire, V.S., (1949)
: Pyrogenicity of influenza virus in rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71 132-133
- 4) Beveridge, W.I.B., Mahaffey, I.W., Rose, M.A., (1965)
: Influenza in horses.
Vet. Rec., 77 57-59
- 5) Brandon, F.B., C.D. Barret, A.E. Hook, G.O. Lease., (1967)
: Human febrile response to influenza virus or its ether isolated
hemagglutinins.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 683-686

- 6) Brandon, F.B., Cox, F., G.O. Lease, E.A. Timm, E. Quinn., I.W. Mclean.,
(1967)
: Respiratory virus vaccines. 3. Some biological properties of
Sephadex-purified ether extracted influenza virus antigens.
J. Immunol. 98 800-805
- 7) Brandon, F.B., Cox, F., Quinn, E., Timm, E.A., Mclean, I.W., (1969)
: Influenza immunization-clinical studies with ether-split subunits
vaccines.
Bull. W. H. O. 41 629-637
- 8) Brander, G.C., Street, B.K., Mann, G., (1965)
: Equine influenza virus vaccine.
Vet. Rec. 77 548-549
- 9) Bryans, J.T., (1966)
: Control of equine infectious disease by immunization.
Cornell Vet., 56 278-287
- 10) Bryans, J.T., Doll, E.R., Willson, M.S., McCollum, W.H., (1966)
: Immunization for equine influenza.
J. Am. Med. Ass., 148 413-417
- 11) Bryans, J.T., (1966)
: Control of equine influenza.
Proc. 1st Int. Conf. Equine Infectious Diseases, Stresal 966 (Grayson
Foundation, Lexington, KY 1966)

- 12) Bryans, J.T., (1964)
: Viral respiratory disease of horses.
Sci. Proc. 101th Ann Meet of Am. Vet. Rec., 77 57-59
- 13) Burki, F., Sibalin, M., (1972)
: Conclusions and questions arising from a study of serology and immunology of equine influenza.
Proc. 3rd. Int. Conf. on Equine Infectious Disease, Paris 1972
- 14) 新 海 健 吉 (1974)
: 定量的血球吸着反応法による Virazole の抗インフルエンザウイルス活性について
ウイルス V24 №2 31 ~ 36
- 15) Cottereau, P., Petermann, H.G., (1969)
: Vaccination of the horse against equine influenza with a polyvalent inactivated vaccine.
Revue. Med. Vet. 120 17-29
- 16) Cromwell, H.A., F.B. Brandon, I.W. Mclean, J.F. Sadusk. (1969)
: Influenza immunization-a new vaccine.
J. Amer. Med. Ass. 210 1438-1442
- 17) Davenport, F.M., (1968)
: Antigenic enhancement of ether-extracted influenza virus vaccines by $AlPO_4$.
Proc. Soc. Exp, Biol. Med. 127 587-590

- 18) Davenport, F.M., A.V. Hennessy, F.M. Brandon, R.G. Webster,
C.D. Barrett, G.O. Lease. (1964)
: Comparisons of serologic and febrile response in humans to
vaccination with influenza A viruses and their hemagglutinins.
J. Lab. Clin. Med. 63 5-13
- 19) Davenport, F.M., Hennessy, A.V., Dresher, J., (1964)
: Cellular biology of myxovirus infections.
Cellular Biology of Myxovirus Infections 272-298 J. & A. Churchill.
- 20) Davenport, F.M., Rott, R., Schäfrer, W., (1960)
: Physical and biological properties of influenza virus components
obtained after ether treatment.
J. Exp. Med., 112 765
- 21) Dawkins, A.T. et al. (1968)
: Studies on induced influenza in man. 2. Double-Blind study designed
to assess the prophylactic efficacy of an analogue of Amantadine
Hydrochloride.
J. A. M. A. 203 1095
- 22) Davius, W.L., Grunert, R.R., et al. (1964)
: Antiviral activity of I-Adamantanamine (Amantadine).
Science 144 862-863
- 23) DeMeio, J.L., Gutekunst, D.E., et al. (1969)
: The evaluation of an experimental bivalent equine influenza virus
vaccine.
J. Am. Vet. Med. Ass. 155 278-281

- 24) Depoux, R. (1954)
Bull. Wld. Helth. Org., 11 981
- 25) Doudle, W.R., Yarbrough, W.B., Robinson, R.Q., (1964)
: U S epizootic of equine influenza 1963. etiology.
Publ. Hlth. Rep., 79 398-402
- 26) Evans, D.G., (1971)
: Report on vaccination against equine influenza.
Joint. Racing Board England.
- 27) Farnik, J., Bruj, J., (1966)
: An outbreak of influenza A₂ in a population with a known antibody
profile.
J. Inf. Dis., 116 425-428
- 28) Fazekas de St. Groth, S.F., R.G. Webster, F.M. Davenport. (1969)
: The antigenic subunits of influenza viruses.
The homologus antibody response.
J. Immunol. 103 1099-1115
- 29) Fenters, J.D., H.M. Yamashiroya, R.F. Petzold, V.K. Tolkacz. (1970)
: Enhanced immunogenicity in mice of a purified, Tween-ether treated
influenza vaccine.
Appl. Microbiol. 20 544-550
- 30) Fleming, R.D., (1963)
: Human virus vaccine effective against equine influenza.
Vet. Med., 58 893

- 31) Fontine, M., Fontine, M.P., (1972)
: Equine infectious disease.
Proc. 3rd int. Equine Infectious Disease, Paris 1972 487-502
- 32) Frerichs, G.N., Burrows, R., Frerichs, C.C., (1973)
: Serological response of horses and laboratory animals to equine
influenza vaccines.
In Equine infectious disease 3, edited by J.T. Bryans, et al. 503-509
- 33) Frerichs, G.N., Frerichs, C.C., (1973)
: Serological response of chickens, rabbits and guinea-pigs to equine
influenza vaccines.
Research in Veterinary Science 14 187-193
- 34) Freund, J., Casals, J., Hosmer, E.P., (1937)
: Sensitization and antibody formation after injection of Tubercle
Bacilli and Paraffin oil.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 37 509
- 35) Freund, J., McDermott, K., (1942)
: Sensitization to horse serum by means of adjuvants.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49 548
- 36) 福見秀雄・武内安恵・石田正年・中山幹男 (1972)
: 新しく流行した馬の A/equi/Miami 型インフルエンザウイルスの抗原構造に
ついて
第 73 回日本獣医学会講演要旨 日獣誌 第 34 巻 学会号

- 37) Grossgebauer, K., Langmaack, H., Schmidt, B., Kuechler, R., (1966)
: Enhancement and neutralization of pyrogenicity of influenza virus
by various biologically active substances.
Arch, Ges, Virusforsch. 28 151-164
- 38) Henle, W., Henle, G., (1945)
: Effects of adjuvants on vaccination of human beings against
influenza.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 59 179
- 39) Hennessy, A.V., F.M. Davenport. (1967)
: Vaccination of infants against influenza with polyvalent influenza
hemagglutinins.
J. Amer. Med. Ass. 200 896-898
- 40) Herbert, W.J., (1965)
: Multiple emulsions, A new form of mineral-oil adjuvant.
Lancet, 2 771
- 41) Hirst, G.K. (1941)
: The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos
infected with influenza virus.
Science, 94 22
- 42) Hirst, G.K. (1942)
: The quantitative determination of influenza virus and antibodies
by means of red cell agglutination.
J. Exp. Med. 75 49

- 43) Jensen, K.E., Francis, T. Jr. (1953)
: The antigenic composition of influenza virus measured by antibody-
absorption.
J. Exp. Med. 98 619
- 44) 金 光 正 次 (1962)
: インフルエンザの流行学的考察
総合医学 19 219 ~ 222
- 45) 北 本 治 (1963)
: 坑インフルエンザ物質に関する研究
日医新報 2031 13
- 46) Konoh, S., Kawasaki, H., (1966)
: Studies on Myxovirus pyrogen (1)
Interaction of myxovirus and rabbit polymorphonuclear Loicocytes.
Biken Jour. 9 177-184
- 47) 甲野雄次・福永昌夫・清水武彦・石谷類造・石川邦生・藤野守正(1972)
: 日本各地で流行した馬インフルエンザのウイルス学的調査
第73回 日本獣医学会講演要旨 日獣誌 第34巻 学会号
- 48) 厚生省編 (昭和46年)
: 生物学的製剤基準
- 49) 熊埜御堂毅・秋山 綽(日競研)(1975)
: ウマインフルエンザ免疫馬に於ける血中及び局所抗体の産生とその免疫効果
第79回 日本獣医学会口演 於都市センター(東京)

- 50) Kumanomido, T., Y. Okuda, Y. Akiyama. (1972)
: Studies on outbreak of equine influenza in Japan in 1971
- Early diagnosis by direct Fluorescent Antibody Technique -
Exp. Rep. Equine Hlth Lab. No.9 29-34
- 51) Kumanomido, T., Y. Okuda, Y. Akiyama. (1972)
: Studies on outbreak of equine influenza in Japan in 1971
- Virus isolation -
Exp. Rep. Equine Hlth Lab. No. 9 35-43
- 52) Langlois, P.J.M. (1969)
: Vaccination of horses against influenza.
Thesis Ecole Nat Vet., Alfort Paris pp46 (Vet. Bull. 40 1970)
- 53) Lief, F.S., Chohen, D., (1965)
: Equine influenza. Studies of the virus and antibody pattern in
convalescent interepidemic and post vaccination.
Am. J. Epidem. 82 225-246
- 54) Lucam, F., Peillon, M., Dannacher, G., et al. (1972)
: Development of post-vaccinal immunity to influenza in the horse,
estimated as a function of antibody kinetics.
Revue de Medecine Veterinaire 123 No.12 1505-1515
(Vet. Bull. 43 No.5 1973)
- 55) Macss, J., Mussgay, M. (1969)
: The antigenic potency of equine influenza vaccines.
Comparison between a vaccine prepared from virus breakdown products
and commercial vaccines.
Zentbl., Vet. Med., 16 404-413

- 56) Maugh, T.H. (1973)
: Influenza 2. A persistent disease may yield to new vaccines.
Science 180 1159-1162
- 57) Mayr, A., Thein, P., Moll, C., (1973)
: Tests on the efficacy of equine influenza vaccines in small
laboratory animals.
Zentralblatt fur Veterinarmedizin 20B Heft 5 325-339
(Vet. Bull. 44-2 1974)
- 58) McQueen, J.L., Davenport, F.M., Minus, E., (1965)
: Studies of equine influenza in Michigan, 1963. 1.etiology.
Am. J. Epidem., 83 271-279
- 59) McQueen, J.L., Steel, J.H., Robinson, R.Q. (1968)
: Animal influenza.
Adv. Vet. Sci., 12 285-336
- 60) Melander, B., (1960)
: N^I,N^I-anhydrobis-(B-hydroxyethyl) biguanide-hydrochloride (ABOB) in
prophylaxis and suppression of experimental influenza.
Antibiot. Chemother. 10 34
- 61) Miller, G.L., Stanley, W.M., (1944)
: Quantitative aspects of the red blood cell agglutination test for
influenza virus.
J. Exp. Med. 79 185

- 62) Mizutani, H., Beals, T., Hennessy, A.V., et al. (1962)
: A symple procedure for purification of viral hemagglutinin.
Virology 17 210
- 63) 長峯 隆・浅原鉄夫・東原 稔・井手誠弥・吉村政雄・五十嵐義晃, 他 (1972)
: 馬インフルエンザワクチンに関する研究
第 74 回 日本獣医学会講演要旨 日獣誌 第 34 巻 学会号
- 64) 中野克重・斉藤 博・川村清市・下田和伸, 他 (1972)
: 馬インフルエンザの発生について, ウイルス分離と HI 抗体価
第 73 回 日本獣医学会講演要旨 日獣誌 第 34 巻 学会号
- 65) 農林省畜産局衛生課編 (昭和 46 年 12 月)
: 馬インフルエンザ発生
家畜衛生週報 № 1177 P425 ~ 426
- 66) 農林省畜産局衛生課編 (昭和 47 年 1 月)
: 馬インフルエンザの防疫について
家畜衛生週報 № 1178
- 67) 農林省畜産局衛生課編 (昭和 47 年 1 月)
: 馬インフルエンザの発生状況について
家畜衛生週報 № 1179
- 68) Phillips, C.F., C.A. Phillips, W.E. Hodgkin, et al. (1973)
: Killed subunit influenza vaccine in children.
Pediatrics. 52 416-419

- 69) Powell, D.C., Burrows, R., (1972)
: Field observation of influenza vaccination of thoroughbred horse.
International Symposium on Influenza Vaccines for Men and Horses.
Vol, 20 332-337
- 70) Pressler, K., (1969)
: Adsorbed vaccine against equine influenza.
Tierarztl. Umsch. 24 584-587 (Vet. Bull. 1969)
- 71) Pressler, K., (1972)
: Serological studies after immunization against equine influenza.
3. Reimmunization two year after the first vaccination and the
antibody level over a 3-year period.
Zentralblatt fur Veterinarmedizin 19B Heft 5, 426-433
- 72) Rose, M.A., (1966)
: Serological studies with influenza viruses.
Brit. Vet. J., 122 435-442
- 73) Rouse, B.T., (1971)
: Equine influenza immunization - the role of nasal antibody - a
review.
Aust. Vet. J. Vol. 47 146-148
- 74) Rouse, B.T., W.J.B. Ditchfield (1970)
: The response of ponies to Myxovirus influenzae A-equi 2.
I. Serum and nasal antibody titers following exposure.
Can. J. Comp. Med., Vol. 34 1-6

- 75) Rouse, B.T., W.J.B. Ditchfield (1970)
: The response of ponies to Myxovirus influenzae A-equi 2.
2. Immunoglobulin classes of antibody to the virus in serum and nasal secretions.
Can. J. Comp. Med. Vol. 34 7-12
- 76) Rouse, B.T., W.J.B. Ditchfield (1970)
: The response of ponies to Myxovirus influenzae A-equi 2.
3. The protective effect of serum and nasal antibody against experimental challenge.
Res. Vet. Sci. Vol. 11 503-507
- 77) Rouse, B.T., A.B. Angulo (1970)
: A method for the collection of nasal secretions from the horse and cow.
Res. Vet. Sci. Vol. 11 98-99
- 78) Ruben, F.L., L.W. Akers, E.B. Stanley, C.G. Jackson (1973)
: Protection with split and whole virus vaccines against influenza.
Arch. Intern. Med. 132 568-571
- 79) 細菌製剤協会編 (1963)
: インフルエンザのアジュバントワクチンに関する討論会
- 80) 細菌製剤協会編 (1969, 1970, 1971, 1972 年度版)
: インフルエンザ SP ワクチン研究会記録
- 81) Salk, J.E., Bailey, N.L., Laurent, A.M., (1952)
: Use of adjuvant in studies on influenza vaccination.
Am. J. Hyg. 55 439

82) Salk, J.E., (1953)

: Use of adjuvant in studies on influenza immunization.

3. Degree of persistence of antibody in human subjects two years after vaccination.

J. Am. M. A. 151 1169

83) Salk, J.E., Laurent, A.M., (1952)

: The use of adjuvants in studies on influenza immunization.

I. measurements in monkeys of the dimensions of antigenicity of virus-mineral oil emulsions.

J. Exptl. Med. 95 429

84) Schild, G.C., Sutton, R.N.P. (1965)

: Inhibition of influenza viruses in vitro and in vivo by I-Adamantanamine Hydrochloride.

Brit. J. Exp. Path. 46 263-273

85) Schäfer, W., Zillig, W., (1954)

: Über den Aufbau des Virus-Elementarteilchens der Klassischen Geflügelpest I. Mitt: Gewinnung, physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften eigener Spaltprodukte.

Z. Naturforsch., 9B 779-788

86) Segert, R., Braune, P. (1964)

: The pyrogens of Myxoviruses 2. Resistance of influenza A pyrogen to heat, ultraviolet and chemical treatment.

Virology 24 218-224

- 87) Shechmeister, I.L., Aeschlimen, T., Kammlase, W.G. (1967)
: Use of sodium alginate adjuvant in immunization.
Am. J. Vet. Res. 28 1373-1378
- 88) 新海健吉 (1974)
: 定量的血球吸着反応法による Virazole の抗インフルエンザウイルス活性について
ウイルス Vol. 24 №2 31 ~ 36
- 89) Sovinova, O., Tumova, B., Pouska, F., Nemec, J., (1958)
: Isolation of virus causing respiratory disease in horses.
Acta Virol. 2 52-61
- 90) Stellman, C., Peterman, H.G., (1974)
: Comparison of SN and HI antibody dose response curves in chickens,
rabbits, foals and horses following vaccination with equine
influenza.
Journal of Biological Standardization 2 No.2 129-137
- 91) Stellman, C., Peterman, H.G., (1972)
: Reproducibility of tests with equine influenza vaccines on
laboratory animals.
International Symposium on Influenza Vaccine for Men and Horses,
Vol. 20 353-361
- 92) Tago, Y., et al. (1968)
: Studies on induced influenza in man.
I. Double-Blind studies designed to assess prophylactic efficacy
of amantadine hydrochloride against A₂/Rockville/1/65 strain.
J. A. M. A. 203 1089

- 93) Tabuchi, E., T. Kumanomido, K. Hirasawa, et al. (1972)
: Studies on outbreak of equine influenza in Japan in 1971.
- Hematological observation -
Exp. Rep. Equine Hlth Lab. No.9 1-9
- 94) Tamm, I. et al. (1965)
: Selective inhibition of viral reproduction.
Viral and Rickettsial Infections of Man.
Lippincot, Philadelphia, Montrial, 305
- 95) Triaui, R., (1971)
: Round-table on influenza vaccination.
Geneva Cointrin 1971 (Fond. Merieux, Lyon 1971)
- 96) Waddelle, G.H., Teighland, M.B., Sigel, M.M., (1963)
: A new influenza virus associated with equine respiratory disease.
J. Am. Vet. Med. Ass. 143 587-590
- 97) Ward, T.G., Saleh, M., (1955)
: Laboratory studies on the relation between influenza antibody and
immunity in mouse.
Amer. J. Hyg. 61 82-88
- 98) Webster, R.G., Laver, W.G., (1966)
: Influenza virus subunit vaccines, Immunogenicity and lack of
toxcity for rabbits of ether and detergent disrupted virus.
J. Immunol. 96 596-605

- 99) Willson, J.C., (1969)
: Comparison of HI antibody response in horses vaccinated with
vaccines prepared with A/2/Equi/Alfort/65 and A/2/Equi/Miami /63
influenza.
Cornell Vet. 59 29-34
- 100) Woodhour, A.F., Jensen, K.E., Warren, J. (1960)
: Antibody response to influenza vaccines combined with Hexadecylamine.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103 200
- 101) Woodhour, A.F., Metzgar, D.P., et al. (1964)
: New metabolizable adjuvant for human use.
I. Development and animal immune response.
Proc. Soc. Expt. Biol., N.Y. 116 516-523
- 102) 吉田慎三・秋山 綽(日競研)・荒木貞勝・武田暁郎(馬事公苑) (1972)
: 1971年末に流行したウマインフルエンザについて
I. 臨床所見
第73回 日本獣医学会講演要旨 日獣誌 第34巻 学会号

Experimental Studies on Equine Influenza Virus Vaccine

Takashi Nagamine

(The Kitasato Institute)

When nasal and pharyngeal swabs were collected from horses with disease symptoms resembling those of influenza during the acute stage and isolation in embryonated eggs was attempted, viruses could be isolated from two of the eight horses. From the results of hemagglutination inhibition (HI) tests and neutralization tests (NT) on the sera of these horses with the influenza-like symptoms during the acute and convalescent periods, no antibodies to the type I Prague strain or the type II Miami strain were found in the serum from the acute stage. It is therefore considered that these strains have not been the epidemic agents in these horses to date. In tests on the serum from the convalescent stage, there was no antibody response to the type I Prague strain and no evidence of an type I epidemic. In the case of antibodies to the type II Miami strain, there were reservoirs with extremely low antibody titers in serum during the convalescent period but only in some of the cases and a type II epidemic was doubtful. When the sera from the acute and convalescent periods were examined using the isolated viruses as antigens, no antibodies against the isolated viruses were found for the acute period but there was a clear antibody response in the case of the convalescent period and it was proven that all horses were infected. From observations of the immunological behavior against immunized ferret serum, it was evident that the isolated strains and type II Miami strain have a common antigenic part but there were clear differences with respect to the behavior against the convalescent period serum of the infected horses and the immunological behavior against immunized chicken serum. It was considered that the isolated Chiba strains occurred as mutants of the type II Miami strain.

Since clear immunological differences were found with the equine

influenza test vaccines, it is considered that the vaccines of the two standard strains, the type-I Prague strain and the type-II Miami strain, are insufficient and incomplete from the standpoint of protection when such viruses are epidemic. Therefore, the production of trivalent vaccines using the isolated strains was investigated.

It is extremely easy for mutants to occur with the influenza A type virus and this presents a major problem in relation to the prophylactic properties of the vaccine. Therefore, it is clearly evident from the studies of Jensen et al. in 1953 that these viruses do not continuously give rise to new antigens by mutation but the antigens are almost always the result of combinations with existing types of antigenic units.

According to the report of Davenport et al. in 1964, only antibodies reacting with the swine strains are produced when guinea pigs are immunized with intact swine influenza viruses. However, when they are immunized with swine HA obtained by ether treatment, antibodies reacting with FM-1, PR8 and A2/AA/23/57 strains are produced. These can also be considered as cases of antigenicity appearing because of entry into sites which are difficult to detect at the occasion of antigenic unit combinations or removal of the covered substances from the antigenic sites, etc. so that there appear to be cases where the antigenicity is greater in the case of HA. When the influenza viruses are treated with ether, soluble lipids are removed and the virus particles come to pieces. In animal experiments based on comparisons of viruses before and after ether treatment, the results showed that pyrogenicity, body weight reductions and other side reactions were extremely weak, almost to the point where they could not be detected, after treatment. HA after ether treatment showed the same production of HI and neutral antibodies as in intact cases. HA vaccine appeared under such circumstances. In other words, the vaccine is made by obtaining the antigens which provide protection against infection by breaking up the virus particles and either removing or

destroying the parts which can cause side effects. HA vaccine has been developed as the first step in approaching an ideal vaccine. Since this vaccine was developed for human influenza, the author applied the concept that there is a possibility of obtaining a large amount of antigen when the pyrogen inducing factor, substances causing side effects, etc. are removed from equine influenza vaccine by ether treatment and that a vaccine with better prophylactic effects than those of conventional vaccines can be produced. The author prepared a vaccine with the extremely high antigen concentration of 1,500 CCA and when this vaccine was compared with the whole virus vaccine, it was found that the pyrogenicity was higher in the whole virus vaccine, showing a clear difference with the HA vaccine in almost the complete range of natural deviation. When the body weight reduction test was performed in guinea pigs and mice, the HA vaccine caused the smallest weight reduction in guinea pigs and there were clear differences in the number of days required for body weight recovery. Although the differences were not very clear in mice, this was probably because of the small amount inoculated. From the results of the potency test in mice, it appeared that there are almost no differences between the whole virus vaccine and the HA vaccine with respect to antigenicity. Davenport et al. did not find any extensive increase in antigenicity when they performed the same type of ether treatment using swine strains.

Concerning the safety of the test vaccine in the field the results were almost the same as those obtained in tests of laboratory animals, e.g. rabbits, guinea pigs, mice, etc. but in the pyrogen test in rabbits there was a clear difference between the whole virus and HA vaccines although no such difference was encountered in the field tests. There were no side reactions such as swelling and induration and the results showed sufficient stability as a vaccine. There is a considerable problem depending on the appropriate use of adjuvants in connection with

vaccine side effects but in many foreign countries, adjuvants are often used to improve antibody response and maintenance. Because a sufficient amount of antigens could be obtained with the author's vaccine, no adjuvant was used so as to avoid the problem of side effects. Therefore, there were fewer side reactions with the HA vaccine and antibody response could be increased, which means that the results can be considered as satisfactory. The author compared the antigenic response in horses for the whole virus and HA vaccines using various inoculation schedules but with both the whole virus and HA vaccines, there was recognized antibody response at all inoculation schedules although the antibody response and maintenance were the best in the case of two inoculations at four week intervals. According to Powell et al., they performed various experiments concerning inoculation schedules and boosters and found that the best antibody response and maintenance were in the group inoculated with a booster four to six weeks after the initial immunization. These results agree with those in experiments performed by the author, Lucam et al. reported that reinoculation after the booster should be performed one year later but the author performed reinoculation six months and one year after the booster and found the antibody response and maintenance good in both cases.

The following is a summary of the results obtained in various experiments performed to isolate the wild epidemic strains of equine influenza virus and develop an effective vaccine.

1. Virus isolation

Two virus strains were isolated from pharyngeal swabs of infected horses and the results of serological test of the isolated viruses showed that they were different from the known A2-type Miami strain in antigenic structure and were mutants of the Miami strain. The results of the cross HI test and the neutralization test were the same for both strains

and it was evident that the isolated strains were the epidemic agents from the results of HI and neutralization tests performed on the sera of the infected horses.

2. Vaccine preparation

Since the isolated strains differed from the known strains antigenically, a trivalent vaccine of three strains, the A1-type A/Eq/Prague/1/56 (Heq1·Neq1), the A2-type A/Eq/Miami/1/63 (Heq2·Neq2) and the isolated A/Eq/Chiba/3/71 (Heq2·Neq2) strains (containing 500 CCA or an equivalent amount of each strain virus) was prepared. At the time of preparation an equine influenza HA vaccine was developed using the HA vaccine, which has few side effects and is currently used in humans, as a model. If the ether treated vaccine was adjusted to an amount of virus equivalent to the amount of whole virus by compensating for the amount of virus included in inter phase removed at the time of the ether treatment, it was evident that immunological capacity equal to or greater than that of the whole virus can be maintained.

3. Vaccine safety

As laboratory safety tests, the whole virus and HA vaccines were compared with respect to the body weight reduction effects in guinea pigs and mice, the pyrogen test in rabbits, etc. No differences were found in the mice. Twenty-four hours after guinea pigs were inoculated with large doses, the weights showed an average decrease of 23.5g with the whole virus vaccine and 5.5g with the HA vaccine and the side reactions were clearly less with the HA vaccine. The number of days it took for recovery of the weight to that before inoculation was four for the whole virus vaccine and two for the HA vaccine, which means that the weights of mice inoculated with the HA vaccine recovered twice as fast. In the pyrogen test, pyrexia occurred at 1.92°C for the whole virus vaccine and 0.42°C for the HA vaccine, which is about one fifth of that with the whole virus

vaccine. The HA vaccine 0.42°C pyrexia was considered to be in accordance with the natural deviation of the rabbit, which is the same as saying that there was no HA vaccine pyrexia. When these vaccines were studied for inoculation side effects in 10 yearlings and 10 three-year-old horses, there was no rise in body temperature and no local or systemic side reactions, which confirmed the safety of the vaccine.

4. Antibody transition

In investigations of antibody transition, 100% antibody response was found. The inoculation schedule considered to be the best was two inoculations at four-week intervals followed by boosters six months and one year later. In this case, there was a clear antibody response to the boosters. When stock experiments were performed by immunizing mice, no changes were found in the antigenicity after storage at 4°C for 12 months and immunization was possible.

From the above results, it is evident that ether-treated equine influenza HA vaccine has the same or greater immunogenicity than the whole virus vaccine, as well as fewer side reactions. It was also shown to retain its immunization capacity after long periods of storage.