

# 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 要 旨

指導：北里研究所

部長 齊藤保二博士

長 峯 隆

## 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が一部認められ、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使用して、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と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云う点で不完全、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て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ま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。又エーテル処理后得られた HA は 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 ワクチンが登上した。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の点では 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<sup>か</sup>な<sup>入</sup>った。

### Ⅲ 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、等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 ワクチンとの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張、硬結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。

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、と云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 を添加しないで十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どの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と思われた。又 Powell ら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 後の再接種について 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 ヶ月、1 年後に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 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. ワクチンの作成

新分離株と既知の株とで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 (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 23.5 g, HA ワクチンで 5.5 g 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℃ で、HA ワクチンは 0.42℃ と Whole virus ワクチンに比べ 1/5 程度の発熱であり、HA ワクチンの 0.42℃ 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。接種間隔で一番良いと思われたのは 4 週間隔 2 回接種群で 6 ヶ月、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℃, 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 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。