

人および動物インフルエンザに関する疫学的研究

(第1報)

北海道における鳥類、馬の人および動物インフル

エンザに対する抗体について

北海道大学獣医学部伝染病学教室

帯広畜産大学公衆衛生学教室

帯広畜産大学微生物学教室

札幌医科大学衛生学教室

野 呂 新 一 砂 川 紘 之

亀 山 邦 夫 佐 藤 七七朗

小 野 悌 二

三 浦 四 郎 宮 前 武 雄

西 武

清 水 亀平次 後 藤 仁

金 光 正 次 阿 部 武 丸

緒 言

インフルエンザウイルスはA、BおよびC型の3型に分類されているが、A型は最近、さらに宿主の由来によって、ヒト、ブタ、ウマおよびトリの4種の亜型に分けられている。

ヒト由来以外のA型ウイルスについての最初の報告は、Shope (1931)¹⁾ によってなされた。

彼は1930年、感冒様疾患のブタの材料をブタに接種継代することによって、ウイルスを分離したが、後年このウイルスは、Shope型ウイルスと言われた。

このウイルス (Shope 型ウイルス) は、1918年の人のインフルエンザの流行に際し、ヒトからブタへ移行した²⁾ ものと推定されており、人の間では1925年までこのウイルスによる流行が認められたが、その後はブタのみに流行が繰り返えされたと言われている。

また越智および宮入³⁾ が朝鮮のブタから分離したインフルエンザウイルスは、その後人に間で流行したFMIに近い株であることがFrancis (1949)⁴⁾ によって報告されるなど、ブタのインフルエンザについては、早くから人のインフルエンザの相互の関連性が注目されている。

また、Fowl plagueの病原体がろ過性であることは、すでにCentani ら (1902)⁵⁾ によって明らかにされ、鶏ペストウイルスと言われたが、Shäfer らは1955⁶⁾、1957⁷⁾ に生化学的、生物学および抗原学的性状から、このウイルスもまたインフルエンザA型ウイルスに属することを証明した。

さらにトリのA型ウイルスは、Roberts ら (1956)⁸⁾ Wilson ら (1961)⁹⁾、Becker (1963)¹⁰⁾ およびWells ら (1963)¹¹⁾ によってアヒル、ニワトリのヒナ、アジサシおよびガチョウなどからそれぞれ分離されたが、

1965年にMassachusetts州で七面鳥から分離されたインフルエンザウイルスは、1957年にアジア大陸にその発生を見た、いわゆる人のアジアカゼウイルスと抗原構造において同一の部分を持つウイルスであることが¹²⁾知られている。

一方、ウマのインフルエンザA型感染の記録は比較的新しく、Sovinova ら (1956)¹³⁾ がウマから初めてA型ウイルスを分離し、これを馬の1型と呼んだ。

さらに1963年に、Waddell ら¹⁴⁾ は馬の2型を分離したが、この馬の2型インフルエンザウイルスに対する抗体が、1880年から1895年に生まれた人々の血清中に存在することがMinuse (1965) ら¹⁵⁾ によって報告されている。

またKilbourne (1968)¹⁶⁾ は実験室内で馬のA型株と人のA型株が容易に交雑種を作り得る事を報告している。

このように人のインフルエンザウイルスとはほぼ同様の抗原構造を有するウイルスが動物から分離され、また動物のインフルエンザウイルスに対する抗体が人の血清中に認められていることなどから、人のインフルエンザウイルスがある種の動物に感染し、抗原変異を起さずに¹⁷⁾ その動物に流行を繰り返していたか、あるいは、Kilbourne の実験のごとく、ウイルスの交雑種が動物の体内で作られ、それらのウイルスが年代を経て、再度、人のインフルエンザの流行源となったことの可能性が推定されている。¹⁸⁾

しかし、わが国では、まだ、人のインフルエンザウイルスが、動物に感染したという報告もなく、また人と動物相互の関係を解明した記録もない。

これらの点から、われわれは、我が国における動物のインフルエンザウイルスならびに人および動物相互

の感染の関係を知るため、第1段階として、北海道各地から鳥類および馬の血清を集蒐し、トリ、ウマおよびヒト系インフルエンザウィルスに対する抗体の保有状況を調査したので、その成績の一端を報告する。

実験材料および方法

1. 検査血清

i) 鳥類

ニワトリおよびその他の家禽：

ニワトリの血清は、1956年より1969年の間に道内各地から集めた585羽の血清である。

そのほか、札幌市内で集めたアヒル39羽、オナガドリ1羽、七面鳥6羽、チャボ1羽の計7羽、合計632羽である。

野鳥：

野鳥の血清は札幌および旭川の動物園から得た、カモ25羽、その他キジ、トビ、ウコッケイ、クジャク、ホロホロ、白鳥、黒鳥、カモメ、ウミネコ、クジャク、タカ計29羽、合計54羽である。

ii) 馬

道内生産馬：

道内生産馬の血清は、一般農家および牧場で生産し、飼育されていた中半血および軽種（アラブおよびサラブレッド）で、年令は1才～24才である。

なお、生産地は北見23頭、十勝49頭、日高25頭の計97頭である。

輸入馬：

1965年から1968年までに主としてイギリスより輸入され、日高で飼育されていたサラ系の24頭で年令は5才～17才である。

2. 抗原

赤血球凝集抑制試験に使用した抗原は、トリ系インフルエンザウィルスとして、A/Duck/England/56, A/Duck/England/62, A/Tern/South Africa/61, A/Turkey/England/63である。

ウマ系インフルエンザウィルスとしては、A/Equi 1/Prague/56, A/Equi 2/Miami/63を用いた。

またヒト系インフルエンザウィルスとして、A/PR 8/34, A/FM 1/47, A/足立/2/57, A/愛知/2/68（香港型）であり、以上10株を用いた。

補体結合反応に使用の可溶性（S）抗原は、A/足立/2/57株の感染漿尿液を超遠心および赤血球吸収により、V抗原を除去したものをを用いた。

3. 検査血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質（HAIインヒビター）の除去

検査使用のニワトリ血清中には、 α および γ インヒビターが、またウマ血清中には γ インヒビターが多量

に含まれている事が知られている。

そのため、検査血清に対してRDE および KIO_4 処理を行なった。

RDE 処理：

56°C、30分非働化した血清1容に市販のRDE 3容を加えて37°Cに16～18時間おいた後、再び56°C、30分加熱してRDEを不活化した。

KIO_4 処理：

56°C、30分非働化した血清1容にM/90 KIO_4 を3容加えて4°Cに1夜静置、翌日、10%グルコース液を3容加えて KIO_4 の作用を止めた。

4. 検査血清中の非特異的赤血球凝集素の除去

動物の血清中には、非特異的に赤血球を凝集する凝集素が含まれており、特にウマ血清に多い。

そのため、血清に5%トリ赤血球を加え吸収除去した。

5. 赤血球凝集抑制試験（HIテスト）

i) RDE 処理血清によるHI

鳥類血清の16倍のみのスクリーニングテストに、RDE 処理血清を用いた。

ii) M/90 KIO_4 処理血清によるHI

鳥類血清のうち、スクリーニングテスト陽性のおよび馬血清全例について、M/90 KIO_4 処理を行ない、さらに28倍から3,584倍まで階段稀釈をして、HIテストを行なった。

iii) 抗原単位

抗原は2単位（8凝集単位）で使用し、稀釈血清との反応時間は4°Cにおいて2時間である。

iv) 判定

判定は、0.5%トリ赤血球液を加え、振盪した後、室温に静置し、1時間後に行なった。

6. 補体結合反応（CFテスト）

鳥類血清のCFテストはKolmerの変法に準じて、モルモットの抗A型（S）血清を指示血清として用いる間接法を行なった。

馬血清のCFは直接法で行なった。

使用抗原は前述のごとくであり、いずれの場合もその4単位を用いた。

実験成績

1. 鳥類血清のHIテスト

i) RDE 処理によるスクリーニングテスト

鳥類血清686例につき、ヒト系、トリ系各々4株の抗原を用いて16倍のみのHIスクリーニングテストを行ない、表1のごとき成績を得た。

表1 鳥類血清のHIスクリーニングテスト

動物種	検査数	陽性数	抗				原			
			ヒト系インフルエンザウィルス				トリ系インフルエンザウィルス			
			A/PR8	A/FMI	A/足立	A/愛知	A/Duck/56	A/Duck/62	A/Tern/61	A/Turkey/63
ニワトリ	585	70	28	33	0	19	0	4	0	2
アヒル	39	9	4	3	0	2	0	0	0	0
カモ	25	6	5	0	0	1	0	0	0	0
七面鳥	6	2	1	0	0	0	1	0	0	0
その他の野鳥	31	4	1	2	1	1	1	0	1	0
計	686	91	39	38	1	23	2	4	1	2

ヒト系に対して82例（2株以上陽性のものも1例とした）、トリ系に対して9例、合計91例が陽性であった。

ii) M/90KIO₄処理によるHIテスト

鳥類血清は、個々の採血量が少ないため、スクリーニングテスト陽性の91例中、34例についてのみM/90KIO₄処理をした血清によるHIテストを行ない、その成績を表2に示した。

表2 スクリーニングテスト陽性検体のM/90KIO₄処理によるHIテスト陽性数

鳥種	検査数	抗				原			
		A/PR8	A/FMI	A/足立/2/57	A/愛知/2/68	A/Duck/56	A/Duck/62	A/Tern/61	A/Turkey/63
ニワトリ	14* ₁	¼* ₂	⅕		½		¼		⅕
アヒル	7	⅕	¼		⅕				
カモ	6	⅕			⅕				
七面鳥	2	⅕				⅕			
その他の野鳥	4* ₃	⅕	⅕	⅕* ₄	⅕	⅕		⅕	
計	34	⅕ ₃	⅕ ₀	⅕	⅕ ₄	⅕ ₂	⅕ ₄	⅕ ₁	⅕ ₂

*₁ 3例2株

*₂ 分母=検査数、分子=陽性数（HI価28倍以上）

表に見られるごとく、ニワトリ1例がA/愛知/2/68に対して224倍、カモ1例が、A/PR8/34に対して56倍、白鳥1例がA/足立/2/57に対して224倍のHI価を示したが、その他はすべて陰性（28倍以下）であった。

2. 鳥類血清のCFテスト

*₃ 1例2株

*₄ 白鳥

M/90KIO₄処理によるHIを行なった34例について、同時にヒト系A型S抗原を用いて行なった間接法によるCFテストでは、全例が陰性であった。

3. 馬血清のHIテスト

抗原別、HI価別に成績を示すと表3のごとくである。

表3 馬血清の抗原別HI価例数（M/90KIO₄処理）

抗	原	HI						価	
		≤28	56	112	224	448	896	1,792	≥3,584
道内生産馬	A/Equi 1/Prague/56	97	0	0	0	0	0	0	0
	A/Equi 2/Miami/63	97	0	0	0	0	0	0	0
	A/愛知/2/68	97	0	0	0	0	0	0	0
	A/足立/2/57	97	0	0	0	0	0	0	0
輸入馬	A/Equi 1/Prague/56	10	1	1	0	0	4	3	5
	A/Equi 2/Miami/63	16	1	3	1	1	2	0	0
	A/愛知/2/68	18	2	1	1	0	2	0	0
	A/足立/2/57	24	0	0	0	0	0	0	0

i) 道内生産馬

道内生産馬は表にあげた4株のインフルエンザウィルスに対して97例すべてが陰性であった。

ii) 輸入馬

道内生産馬に対して、輸入馬は24例中18例が1種以上の抗原に対して56倍以上のHI価を示した。

表4 CF陽性馬血清のHI価との比較

例No	HI		価		CF価
	抗	原	原		
	A/Equi 1/P rague/ 56	A/Equi 2/Miami/ 63	A/足立/2/57	A/愛知/2/68	A/足立/2/57 S抗原
1	≥3,584	56	<28	112	8
2	1,792	<28	<28	<28	4
3	≥3,584	896	<28	896	8
4	≥3,584	448	<28	896	16
5	896	<28	<28	28	2
6	112	<28	<28	<28	4
7	896	896	<28	224	16

A/Equi 1 に対する陽性 (56倍以上) は14例で、そのHI 価の 3,584倍以上のものは5例であった。

A/Equi 2 およびA/愛知/2/68に対する陽性は8例および6例であり、そのHI 価の最高は896倍であった。

4. 馬血清のCFテスト

輸入馬のHI陽性18例について、CFテストを行なったところ、7例が2倍から16倍までのCF価を示した。

この7例のA/Equi 1, A/Equi 2, A/足立/2/57 およびA/愛知/2/68に対するHI 価とA/足立/2/57のS抗原に対するCF 価とを比較した成績が表4である。

7例はすべてがA/Equi 1 に対して112倍以上のHI 価を示し、そのうち4例は、A/Equi 2 およびA/愛知/2/68に対しても56倍以上のHI 価を示した。

考 察

インフルエンザにおける人と動物相互感染の可能性を示すものとして、Shope 型ウィルスを初め、越智らによって分離されたFMI 類似株、Massachusetts 州の七面鳥由来株と人のウィルスとの類似性、また1800年代の終りに生まれた人々が保有する馬2型株に対する抗体、さらにまた Kilbourn の行なった馬と人インフルエンザウィルスとの試験管内再合成などがあげられる。

一方わが国においては、このようなインフルエンザの相互感染の問題を取り扱った研究はほとんど見られない。

われわれは、この問題を研究する第1段階として、多くの鳥および馬について種々のインフルエンザウィルスに対する抗体を測定した。

鳥類のHIテストでは結局、3例のみヒト系インフルエンザに対して陽性を示したが、この3例もCFは陰性であったことから、インヒビターの可能性が強く、鳥類の場合は、いかなるインフルエンザ感染の確証も得られなかった。

しかし馬では輸入馬18例がHI 陽性であり、このうち7例がCF(S)テスト陽性であったことから、これら輸入馬がなんらかのA型インフルエンザウィルスの自然感染をうけたことが考えられ、今回の試験成績から、馬の1型および2型による可能性が考えられる。

今回の共同研究者である阿部は、馬血清中のA/愛知/2/68に対するHAインヒビターはKIO₄処理resistance のものが多く、今回のA/愛知/2/68に対する抗体価として示された値は、馬2型に対する抗体の随伴抗体および未破壊のインヒビターとの合値であろうと提案し、我々もそう考えている。

これら輸入馬の1型および2型ウィルスに対する抗体を個々の馬がその生産地で得たか、輸入後わが国において感染したためのものであるかについては確認できなかった。

馬の輸入先であるイギリスにおいては、馬のインフルエンザが、1965年以来2型によるものが多く報告されている²⁰⁾²¹⁾²²⁾が、我々の試験馬は年齢差が広範な故に、1型および2型両型に対する抗体が検出された。

これらの馬のワクチン歴は不明であるが、少なくともS抗体を保有していた馬については、ワクチンの作用による抗体の上昇ではなく、自然感染によると考えられる。

今回の試験では、そのHI 価が高値であるが、動物の抗体を測定するにあたり、少量の抗体を検出する目的で2単位(8凝集単位)の抗原を使用し、かつ血清処理法がRDE, KIO₄単独であり、2つを併用しなかったため未破壊のインヒビターの作用が全般にでているためと考えた。

これらの点がA/Equi 1 の場合においても、HI 価が大きく、CF 価との差の大きい理由であろう。

なお、今回の試験には通常のトイレを使用したのが、今後はマイクロトレイを使用して、血清量の不足を補

うようにしたい。

我々が実施した調査の頭数は十分ではないが、この調査の限りでは道内生産馬がいかなるインフルエンザウィルスに対する抗体も保有していないことが証明され、我が国には馬インフルエンザの侵入のまだないことの一端がうかがわれた。

しかし、1971年12月、東京その他の競馬場を中心とする馬に感冒様疾患が多発し、我が国では初めて患馬から多数の馬2型インフルエンザウィルスが分離^{23) 24)}された事は興味深い。

結 語

我々は、人および動物インフルエンザの相互関係を研究する第1段階として、今回鳥類686例および馬121例について、種々のインフルエンザウィルスに対する血中抗体を測定したところ、次のごとき成績を得た。

1) 鳥類血清 686例のRDE 処理によるHIスクリーニングテスト(16倍のみ)を行ない、ヒト系インフルエンザウィルスに対して82例、トリ系インフルエンザウィルスに対して9例の陽性例を検出した。

2) この陽性例をM/90KIO₄処理して、HIテストを行なったところ、トリ系インフルエンザウィルスに対してはすべて陰性であったが、ヒト系インフルエンザウィルスに対しては、ニワトリ1例がA/愛知/2/68株に224倍、カモ1例がA/PR 8/34株に56倍、白鳥1例がA/足立/2/57株に224倍のHI価を示した。

しかし、上記3例を含む全例は、CF抗体を保有しなかった。

3) 道内生産馬97例のM/90KIO₄処理によるHIテストでは、ウマ系およびヒト系インフルエンザウィルスに対して全例が陰性であった。

4) 輸入馬血清24例のM/90KIO₄処理によるHIテストでは、ウマ系およびヒト系インフルエンザウィルスの1つ以上の株に対して18例が陽性であった。

この18例中7例は、自然感染により、CF(S)抗体を保有していた。

(この調査研究は、昭和44年度の文部省の科学研究費の補助を受け、研究成績の概要は、昭和45年、第69回日本獣医学会で発表した)

文 献

- 1) Shope: Journal of Experimental Medicine, **54**, 373, (1931).
- 2) Koen: The journal of the American Veterinary Medical Association, **14**, 468, (1919).
- 3) 越智勇一, 宮入一雄: 日本獣医学雑誌, **5**巻,

242, (1944).

- 4) Francis: Proc. Soc. Exp. Biol & Med., **71**, 216, (1949).
- 5) Centani: Centralblatt für Bacteriologie, Parasitenkunde Originale, **31**, 145 und 182, (1902).
- 6) Schäfer: Zeitschrift für Naturforschung, **106**, 81, (1955).
- 7) Shafer: Ciba Foundation Symposium, Nature of Viruses, **91**, (1957).
- 8) Roberts: The Veterinary Record, **76**, 470, (1964).
- 9) Wilson: Cited by Pereira, Bulletin of the World Health Organization, **32**, 855, (1965).
- 10) Becker: Virology, **20**, 318, (1963).
- 11) Wells: The Veterinary Record, **75**, 783, (1963).
- 12) Pereira: Bulletin of the World Health Organization, **35**, 799 (1966).
- 13) Sovinova: Acta Virologica (Prague), **2**, 52, (1968).
- 14) Waddell: The journal of the American Veterinary Medical Association, **143**, 587, (1963).
- 15) Minuse: Journal of Immunology, **94**, 563, (1965).
- 16) Kilbourne: Science, **160**, 74, (1968).
- 17) Mulder: Lancet, **1**, 810, (1958).
- 18) McQueen: Advanced in Veterinary Science, **12**, 285, (1968).
- 19) 阿部武丸: ウィルス, **22**巻, 2号(1972)に投稿の予定。
- 20) Rose: The Veterinary Record, **77**, 404, (1965).
- 21) Miller: The Veterinary Record, **77**, 455, (1965).
- 22) Beveridge: The Veterinary Record, **77**, 427, (1965).
- 23) 熊埜御堂毅: 第73回日本獣医学会, 講演要旨(1972)
- 24) 甲野雄次: 第73回日本獣医学会, 講演要旨(1972).

Epidemiological Studies of Human and Animal Influenza (Part 1)

On the antibody response to human and animal influenza virus in avian group and horses in Hokkaido

Shinichi Noro, Hiroyuki Sunagawa, Kunio Kameyama, Nanao Sato, Teiji Ono

Shiro Miura, Takeo Miyamae

(Department of Infectious Disease,
Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Takeshi Nishi (Department of Public Health,
Obihiro Zootechnological Colledge)

Kiheiji Shimizu, Hitoshi Goto
(Department of Microbiology, Obihiro
Zootechnological Colledge)

Masatsugu Kanamitsu, Takemaru Abe
(Department of Hygiene, Sapporo
Medical Colledge)

Antibody of 686 avian sera and 121 horse sera against various influenza viruses was tested as the first step for study of human and animal influenza interrelationships.

1. HI antibody of RDE treated 686 sera from avian group was demonstrated by screening test at a dilution of 1:16.

Eighty two of 686 was positive against human influenza virus and 9 against avian influenza virus.

2. HI antibody against avian influenza virus

was destroyed by M/90 KIO₄ treatment, while, one fowl serum had antibody 1:224 against A/Aichi/2/68, and one wild duck serum at 1:56 against A/PR8/34, and one swan serum at 1:224 against A/Adachi/2/57 of human influenza virus.

However, all avian sera including positive 3 cases had no CF(S) antibody.

3. M/90KIO₄ treated sera from 97 Hokkaido domestic horses showed no HI antibody against horse and human influenza viruses.

4. Of 24 imported horse sera treated with M/90 KIO₄, 18 was positive against either horse or human influenza viruses.

Among 18 sera, 7 had CF(S) antibody by natural infection.

(These investigation were supported by a Grant for Scientific Research from the Ministry of Education in 1969)