



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト、カモおよびブタにおけるインフルエンザウイルスの生態学的研究
Author(s)	有川, 二郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第2888号
Issue Date	1985-09-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32731
Type	doctoral thesis
File Information	2888.pdf



正 誤 表

頁	行	誤	正
1	18	隱	穩

ヒト、カモおよびブタにおけるインフルエンザ
ウイルスの生態学的研究

有川 二郎

目 次

緒言	1
第1章　ブタにおけるインフルエンザの流行調査——血清疫学的研究	6
要旨	7
序文	9
材料および方法	12
1. ウイルス	12
2. 抗血清	12
3. ブタ血清の採取	14
4. 血清学的診断法	14
1) 赤血球凝集抑制(HI)試験のための血清処理	14
2) 赤血球凝集素(HA)価の測定法および赤血球凝集抑制(HI)試験法	15
3) ノイラミニダーゼ(NA)活性の測定法およびノイラミニダーゼ抑制(NAI)試験法	16
5. ウイルス分離	21
6. セファデックスG-200カラムによる血清の分画	22
7. 蛋白定量	22
成績	23

1.	ブタにおける香港型インフルエンザの流行	23
2.	ブタ型インフルエンザウイルスの出現	23
3.	ブタ型および香港型インフルエンザウイルスの二重流行	31
4.	遺伝的組換えウイルスの出現	33
5.	ブタにおけるヒトH1型インフルエンザウイルスの感染	39
6.	ヒトとブタにおけるインフルエンザ流行の関連	40
考察		46
第2章	カモ、ブタおよびヒト由来インフルエンザウイルスの解析	51
要旨		52
序文		55
材料および方法		57
1.	野生のカモからの検体の採取	57
2.	ウイルス分離	57
3.	ウイルス	57
4.	ウイルスの精製	59
5.	抗血清	59
6.	血清学的診断法	61
1)	赤血球凝集抑制(HI)試験法	61
2)	ノイラミニダーゼ抑制(NAI)	

試験法	61
3) 二重免疫拡散 (IDD) 試験法	61
7. ウイルスのクローニング	62
8. 遺伝的性状の解析	62
1) ウイルス RNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析	62
2) 二次元電気泳動法によるウイルス RNA オリゴヌクレオチドの解析	63
9. ブタに対する実験感染	63
成績	65
1. 野生のカモからのインフルエンザウイルスの分離	65
1) 分離状況	65
2) 分離ウイルスのエンベロープ抗原の同定	66
3) 二重感染個体からのウイルスの分離とクローニング	75
2. ブタ, カモおよびヒト由来 H1 型インフルエンザウイルスの性状	79
1) 血清学的性状	79
2) 遺伝学的性状	83
3) ブタに対する実験感染	85
考察	91
第3章 ヒトにおける A 型インフルエンザ	

の流行	99
要旨	100
序文	102
材料および方法	103
1. ウイルス分離と同定	103
2. 抗血清	103
3. 調査対象血清	104
4. 血清学的診断法	104
5. 限界希釈法によるウイルスのクローニング	104
成績	106
1. 分離ウイルスの性状	106
2. 中学生における血清学的調査	106
3. 遺伝的組換えウイルスのクローニング	112
考察	118
総括	123
謝辞	130
引用文献	131
英文抄録	142

結 言

インフルエンザは人類に残された最後の大流行病と云われている。毎年、世界各地で多数の患者が発生し、その社会的損失は莫大な額になると考えられる⁶⁾。インフルエンザの流行はワクチン接種などの予防法が講じられているにもかかわらず毎年反復して発生しているが、その原因としてウイルスの抗原変異があげられる。

インフルエンザウイルスはウイルス粒子内のRNAを含む核蛋白(ヌクレオプロテイン)の抗原性から大きくA, B およびC型に分けられる⁵⁹⁾。ヒトにおける流行はA型とB型インフルエンザウイルスで認められる。A型インフルエンザウイルスによる流行は大規模で世界的に拡大するが、B型インフルエンザウイルスでは比較的狭い地域で発生する傾向にある。一方、C型インフルエンザウイルスによる流行は一般に認められず、またそれに感染しても症状の隠やかなことが多く、臨床的にとらえることはほとんど不可能とされている。¹³⁾ 穩

A型とB型インフルエンザウイルスのエンベロープ表面には赤血球凝集素(HA)蛋白とノイラミニダーゼ(NA)蛋白が存在しており、それらはスパイク状に表面に突起している。HA蛋白には種々の動物の赤血球に吸着し、それを凝集する作用があ

⁵⁰⁾、NA蛋白にはノイラミニダーゼ活性がある⁷⁾。
 C型インフルエンザウイルスにはHA蛋白の存在のみが確認されている²²⁾。それらの蛋白の抗原性からA、BおよびC型インフルエンザウイルスはそれぞれの型の内でさらに株毎に細かく区別することができる。しかし、B型およびC型インフルエンザウイルスでは株間でのそれらの抗原性の変化は少なく、数10年隔って分離された株の間にも抗原性のわずかな相違がみられるのみである。ところが、A型インフルエンザウイルスにおいてはその抗原性は2種類の異った様式によって速かに変化する。第1はHAやNAの抗原性が既存のA型インフルエンザウイルスのものとは全く交差しない新しい型(亜型)のものに変化する *antigenic shift* (大変異, 不連続変異) である。このような *antigenic shift* 株はこれまでの観察では約10年を周期として突然出現している。世界中の人々はその新しい株に対して免疫を保有していないために汎流行が引き起こされることになる。アジア型インフルエンザウイルス, 香港型インフルエンザウイルスなどがその例で、汎流行株 (*pandemic strain*) と呼ばれる。第2は、同一亜型内でその抗原性が毎年少しずつ変化する *antigenic drift* (小変異, 連続変異) と呼ばれるものである。例えば、A/Hong Kong/1/68 (H3N2), A/

Port Chalmers /1 /73 (H3N2) 株などが香港型インフルエンザウイルスの中での各年代の代表的な drift 株である⁶⁹⁾。

以上のように A 型インフルエンザウイルスはその抗原性が変化しやすいわけであるが、その流行を制圧するためには特に antigenic shift 株の出現を予想し、それに対して効果的なワクチン接種などの予防処置を及ぼさなければならないと考えられる。しかし、このような antigenic shift 株出現の機序に関しては全く不明であった。最近、新たな antigenic shift 株がヒトのインフルエンザウイルスとヒト以外の動物のインフルエンザウイルスとの間での遺伝的組換え (genetic reassortment) によって出現するとする仮説が提唱されてきた^{29, 60, 70)}。

インフルエンザウイルスの RNA は 8 本の分節に分かれているために複数のウイルス株が同時に感染した場合、感染細胞の中で RNA 分節が互いに交換された遺伝的組換えウイルスが高頻度に出現することが知られている^{47, 48)}。このために、ヒト流行株と動物のインフルエンザウイルスがある宿主で重感染の機会に恵まれた場合、動物のウイルスの HA 抗原を保有してヒトに病原性を発揮できるようなヒトの新しい抗原変異株の出現する可能性がある。

HA抗原に対する抗体はウイルス感染防御に有効であるとされている。しかし、ヒトは元来動物のインフルエンザウイルスに対して暴露された経験をもたないために、動物由来インフルエンザウイルスの抗原をもってヒトに適応した新しい変異株に対してヒトは抗体を保有していない。このため、いったん、このようなヒトの流行株が出現した場合、爆発的な流行や汎流行を引き起こすと考えられる。実験的にも七面鳥やブタにおけるインフルエンザウイルスの重感染によって高頻度に遺伝的組換ウイルスの出現することが示されている^{27, 68)}。加えて、~~香港型~~インフルエンザウイルスがアジア型インフルエンザウイルスとトリまたはウマのインフルエンザウイルスとの間での遺伝的組換の結果出現したと考えられる証拠が蛋白レベルでもまた、遺伝子レベルでの解析でも示されている^{12, 32, 33, 38, 39, 40, 49, 69)}。

世界保健機構 (WHO) はヒトにおける汎流行株の出現にヒト以外の動物のインフルエンザウイルスが関与している可能性があると考え、家畜や野生動物におけるインフルエンザの流行調査を大規模に実施している。本研究は動物におけるインフルエンザの国際的な流行調査の一環として、我国におけるヒト、野生のカモおよびブタにおけるインフルエンザ流行状況を総合的に解析し、ヒトと

動物のインフルエンザ流行の関連性について考察したものである。

著者はまず、ブタにおけるインフルエンザ流行を血清疫学的に調査し、ヒトにおけるインフルエンザ流行とブタにおけるそれとの関連性を検討した。次に、我国に飛来する野生のカモを対象にウイルス分離を試み、分離ウイルスの抗原性と遺伝的性状を解析した。また、ヒトにおいてはインフルエンザの流行状況を中学生を対象に流行前後に採血した組血清を用いて血清疫学的に解析した。さらに、ヒト、ブタおよびカモという3種類の異った宿主から分離されながら、抗原的に近縁なウイルスについては遺伝学的性状および病原性の解析を通してそれら株間の関連性を検討した。

第1章

ブタにおけるインフルエンザの流行調査 ——血清疫学的研究——

要 旨

宮城県下のブタを対象にして香港型インフルエンザウイルスとブタ型インフルエンザウイルスに対する抗体調査を実施し、ヒトの流行とブタの流行の間の関連性について疫学的に考察を加えた。

1977年7月から1980年8月まで、仙台市食肉検査所において毎月50頭ずつから採血し、血中のHI抗体価を測定した。

香港型インフルエンザウイルスに対する陽性血清は県内のほぼ全域から得られ、本ウイルスによる流行がブタの間に既に存在していたことが明らかであった。陽性率の上昇は1978年および1980年春期に観察され、ヒトにおける香港型インフルエンザ流行と対応した季節的変動を示した。1979年春期にも低率であるが陽性血清が得られた。この時期、宮城県下のヒトの間では香港型インフルエンザの流行は全く認められなかったことから、ヒト流行株の潜在的保有宿主としてのブタの役割が注目された。陽性血清に対しては、香港型インフルエンザウイルスの4株の代表的変異株を用いて抗体測定を実施し、感染ウイルス株の推定を試みた。1973年流行株に対して最も高い抗体価を示す血清の認められる一方、1980年のヒト流行株に感染したと考えられるブタ血清も得られた。以上の

如く、ブタ集団の中にはヒトにおける流行株と抗原的に関連したいくつかの香港型インフルエンザウイルスが存在しているものと考えられた。

ブタ型インフルエンザウイルスに関しては1977年9月に初めて陽性血清が検出され、宮城県下のブタに本ウイルスの侵入のあったことが確認された。以後2回の流行を経て、その浸淫地域が全県にわたり拡大したことが明らかとなった。また、1978年4月に得られた気管ぬぐい液から、New Jersey株と抗原的に近似した4株のH1N1株の分離に成功し、ブタ型インフルエンザウイルスの存在が確認された。陽性血清のなかには香港型とブタ型いずれの株に対しても抗体を保有しているものもあった。さらに、1農場のブタにおいては香港型とブタ型インフルエンザウイルスの遺伝的組換えウイルスと思われるH1N2株の流行のあったことが血清疫学的に証明された。また、1例ではあるがヒトH1株感染を示す検体も得られた。以上のよう
うに、宮城県下のブタの間には香港型とブタ型の2種類のインフルエンザウイルスによる2重流行が発生し、さらにまた、個体レベルにおいても重感染のあったことが確認された。すなわち、ブタはヒト流行株の病原巣として、また、ウイルス間の遺伝的組換えの場として重要な役割を果たす可能性が強く示唆された。

序 文

1918年ヒトにおけるスペイン風邪の汎流行の発生していた頃、アメリカ合衆国中西部の養豚地帯のブタの間に類似した疾患の発生していたことを KOEN *et al.*⁶⁾ が報告した。ブタでのこの流行はヒトにおけるインフルエンザ流行時期に一致して発生し、かつその症状はそれまでその地域のブタには認められなかったものであり、しかも、当時流行していたヒトのインフルエンザと症状が極めて類似していた。このため KOEN はヒトとブタのこれらの疾患は同一のものと考え、ブタにおいてはブタインフルエンザと名付けた。

本病の流行はその後長く同地域のブタで観察されていたが、当時、ブタインフルエンザの病原ウイルスの分離はできなかった。1930年になり、SHOPE *et al.*⁵³⁾ はこの疾患の病原体が浮過性であって経気道的にブタからブタへ伝達し得ることを示した。さらに、SMITH *et al.*⁵⁸⁾ および SHOPE *et al.*⁵⁴⁾ はこれがフェレットに感染し得ることを実験的に立証し、ブタインフルエンザウイルスの分離がヒトインフルエンザウイルスの分離に先立って成功した。

SHOPE *et al.*⁵⁵⁾ はさらに、分離されたブタインフルエンザウイルス — A/swine/Iowa/15/30 (H1N1)

株——を用いてヒトの抗体測定を実施し、1918年から1919年の流行を経験した年齢の人々に抗体保有例が多く認められることを示した。このため、このブタインフルエンザウイルスは1918年から1919年にかけて全世界的に流行し、2,000万人以上の死亡者を記録した、いわゆる“スペイン風邪”の病原ウイルスと抗原的に極めて類似していると考えられた。本ウイルスはヒトの間での流行が終息したあと長くアメリカ中西部の養豚地帯でブタの間で伝播し続けていたと云われている。

1976年米国 New Jersey州、Fort Dix において、抗原的にブタ型のインフルエンザウイルス——A/New Jersey/8/76(H1N1)株 によるヒトの流行が発生した³⁶⁾。スペイン風邪の再来が危惧されたが、流行は短期間のうちに限定した範囲で終息した。この事件を契機としてインフルエンザウイルスのヒトからブタ、あるいはブタからヒトへの直接伝播の可能性が示唆されるようになった³⁷⁾。

香港型インフルエンザウイルスに関しては1968年にヒトにおける最初の流行が確認されて以後、ほぼ時期を同じくしてブタでの感染例の存在が明らかにされた³⁸⁾。特にアメリカ合衆国では、従来から血清疫学的調査やウイルス分離の成績から、ブタ型インフルエンザウイルスが広く分布しているばかりでなく、ヒト流行株である香港型ウイル

スと近似したウイルスによる流行も混在していることが指摘されてきた^{19, 43)}。

一方、我国における疫学的調査では、1976年にいたるまで香港型インフルエンザウイルスによる感染と流行のみが記録されているが、ブタ型インフルエンザウイルスの存在を示唆する成績は得られていない^{45, 52, 75)}。また、ヒトの流行とブタ型インフルエンザウイルスについての調査は極めて少ない⁷⁸⁾。

著者は宮城県下のブタを対象にしてインフルエンザの流行を血清疫学的に調査し、ブタ型インフルエンザウイルスの浸淫の有無を明らかにした。さらに、香港型とヒトH1型の両インフルエンザウイルスに対する抗体測定成績をもとに、ブタがヒト流行株に感染し、かつウイルスを保持し続けてヒトに対する新しいレゼルボア動物としての役割を果たし得るかどうかを検討した。

材料および方法

1. ウイルス

用いたウイルス株を表 1-1 にまとめた。いずれの株も 10 日齢発育鶏卵尿膜腔に接種し、 35°C で 48 時間培養した。これを 4°C 、1 夜静置してから感染尿膜腔液を採取し、 $3,000\text{ rpm}$ 30 分間遠心した上清を抗原として血清反応に使用した。赤血球凝集抑制試験用抗原としては、遠心上清に 0.05% ホルマリンを加えて不活化したものを、また、ノイラミニダーゼ抑制試験用抗原としてはホルマリン無添加で -80°C に凍結保存したものを使用した。

2. 抗血清

抗血清はいずれも米国疾病管理センターのマニュアルに従い、ニワトリで作製した。すなわち、ウイルスを発育鶏卵尿膜腔で増殖させ、感染尿膜腔液を採取した。これを $3,000\text{ rpm}$ 30 分間遠心して細胞成分を除いたあと赤血球凝集素 (HA) 価を測定した。HA 価が 1:256 未満のものは尿膜腔液をさらに $100,000\text{ g}$ 、60 分間遠心してウイルスをペレットにし、これをリン酸緩衝食塩水 (PBS, $\text{pH } 7.2$) に再浮遊させ、HA 価を 1:256 とした。免疫は上記感染尿膜腔液または濃縮ウイルス液 5 ml を予め A 型インフルエンザウイルスに対して抗体を保有していないことを確認したニワトリ (白色レグホー

表1-1 使用ウイルス株名

A/swine/Iowa/15/30(H1N1)

A/New Jersey/8/76(H1N1)

A/FM/1/47(H1N1)

A/USSR/92/77(H1N1)

A/RI/5 /57(H2N2)

A/愛知/2/68(H3N2)

A/女川/1/73(H3N2)

A/Victoria/3/75(H3N2)

A/Texas/1/77(H3N2)

A/山梨/20/77(H3N2)

A/swine/神奈川/1/78(H1N2)

* A/equine/Prague/1/56(H7)-

A/Port Chalmers/1/73(N2)

* A/equine/Prague/1/56 株のHA抗原と
A/Port Chalmers/1/73 株のNA抗原を
もつ遺伝的組換えウイルス

ン) の翼下静脈から接種して実施した。1週間後に全採血して免疫血清とした。

3. ブタ血清の採取

1977年7月から1980年8月まで毎月1回、仙台市食肉検査所においてと殺された6から7ヶ月齢のと場豚のなかから50頭分採血した。血液は37℃で1時間静置したあと、4℃に1夜静置した。翌日、3,000 rpm 30分間遠心を行って血清を分離し、-20℃に保存した。

4. 血清学的診断法

1) 赤血球凝集抑制(HI)試験のための血清処理

ブタ血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質および非特異的赤血球凝集素の除去はJENSEN²⁴⁾および阿部¹⁾の方法を若干改変し、以下の如く行った。0.8%トリフシン(Difco社, 1:250) PBSを処理血清の半量加え、37℃、1時間反応させた。これを56℃、30分間加温し、トリフシンを不活化したあと、1/90 M 過ヨウ素酸カリウム液を3容量加え、37℃、1時間反応させた。次に、1% グリセリン加生理食塩水を3容量加え、過ヨウ素酸カリウムの作用を中和した。続いて、50%(v/v)ニワトリ赤血球浮遊液を5容量加え、4℃で1時間作用させて非特異的赤血球凝集素を吸収した。途中をないし3回血球を再浮遊させた。これを3,000 rpm 30

分間遠心し、上清を血球処理血清として使用した。処理後の血清希釈倍数は 1:10 であった。

ニワトリ血清の処理はレセプター破壊酵素 (RDE、武田製薬) を用いた。すなわち、RDE 液 3 容量を血清に加え、 37°C 、18 時間反応させた。これを 56°C 、30 分間加温して酵素活性を失活させて使用した。

2) 赤血球凝集素 (HA) 価の測定法および赤血球凝集抑制 (HI) 試験法

0.5% ニワトリ赤血球を用いたマイクロ法を使用した。

感染尿膜腔液の HA 価の測定は以下の如く行った。すなわち、96 well のポリスチレンマイクロプレート (V 底)、タイターテックマルチピペットおよび PBS を用いて 0.025 ml の感染尿膜腔液の 2 倍階段希釈列を作った。さらに全ての well に 0.025 ml ずつ PBS を加え、全量を 0.05 ml とした。次に、0.5% (v/v) ニワトリ赤血球浮遊液を 0.05 ml ずつ加えて振盪したあと、 4°C で 1 時間静置した。明瞭な血球凝集の観察された抗原液の最大希釈倍数の逆数を HA 価とした。

HI 価の測定は以下の如く行った。すなわち、96 well のマイクロプレート上で処理血清 (1:10 または 1:4 希釈) の 0.025 ml を PBS で 2 倍階段希釈をした。そこへ、4 HA 価 / 0.025 ml に調整された抗

原液を0.025 mlずつ加えて良く混和した後、室温に1時間静置し、抗原、抗体反応を行なった。次に、0.5% ニワトリ赤血球浮遊液を0.05 ml 加えて振盪後4℃で1時間静置した。赤血球凝集抑制の認められた血清の最大希釈倍数の逆数をHI価とした。抗原液のかわりにPBSを加えた血清対照群を作り、処理血清中の非特異的赤血球凝集素の除去を確認した。ブタ血清ではHI価1:40以上を、ニワトリ血清ではHI価1:16以上を陽性とした。

3) ノイラミニダーゼ (NA) 活性の測定法およびノイラミニダーゼ抑制 (NAI) 試験法

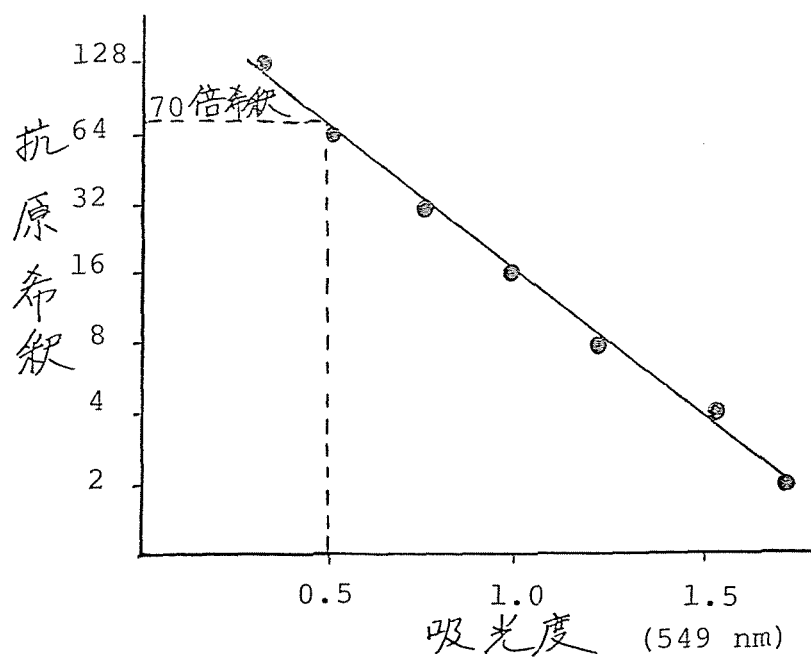
これらの方法は Fetuin (基質) から NA によって遊離されるシアル酸を AMINOFF et al. の方法に基づいて定量することにより実施した²⁾。

操作は米国疾病管理センターのマニュアル¹⁰⁾に従い、以下の如く行なった。NA 活性を測定するための抗原には感染尿膜腔液を用いた。NAI 抗体測定に用いる抗原は予め0.1% Nonidet P40で可溶化し、被検血清中のHI抗体による立体障害を防止した⁷⁾。抗原を生理食塩水で0.5 ml ずつの2倍階段希釈を行ない1:2 から1:128までマスターダイリューションを作った。それぞれの希釈抗原液から0.05 ml ずつ別の試験管にとり、0.05 ml ずつの抗原希釈列を2組作った。その1組はNA試験列として用い、基質混合液 (Fetuin, Gibco 社、

spiro method を 10 mg/ml に蒸留水に溶解したものの、 6 mM 塩化カルシウム加 0.4 M リン酸緩衝液 $\text{pH} 5.9$ および生理食塩水をそれぞれ等量混和したもの) を 0.15 ml ずつ加えた。もう 1 組の対照列には基質混合液のかわりに生理食塩水を 0.15 ml ずつ加えた。また、 0.05 ml の生理食塩水と基質混合液 0.15 ml を加えた Fetuin 対照も作製した。試験管に栓をして反応液の蒸発を防ぎ、 37°C の水浴器中で 18 時間反応させた。これを 20°C の恒温槽中において過ヨウ素酸試薬 (メタ過ヨウ素酸ナトリウム 4.28 g を蒸留水 38 ml に溶解後、リン酸 62 ml を加え混和したもの) 0.1 ml を試験管に加えて振盪したあと 20 分間静置、反応させ、遊離シアル酸を酸化した。この後、全試験管に亜ヒ酸試薬 (亜ヒ酸ナトリウム 10 g 、無水硫酸ナトリウム 35.5 g を蒸留水 100 ml に溶解後、濃硫酸 0.3 ml を加えたもの) 1.0 ml を加え、褐色の色調が退色するまで混和し、過ヨウ素酸の反応を止めた。次に、4オバルビツール酸試薬 (2-4オバルビツール酸 3.0 g 、無水硫酸ナトリウム 35.5 g を蒸留水 500 ml に沸とう水中で溶解したもの) 2.5 ml を加えて良く混和したあと 15 分間沸とう水中にて温浴してから氷水中に移し、速かに温度を下げた。遊離シアル酸から過ヨウ素酸酸化によって生じた β -ホルミルピルビン酸は 4オバルビツール酸と反

図1-1 ノイラミニダーゼ (NA) 活性の測定 (例)

	抗 原 希 釈						
	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x128
NA 試験	1.775	1.570	1.225	1.030	0.770	0.490	0.320
ウイルス対照	0.053	0.025	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000
真のNA活性	1.722	1.545	1.214	1.028	0.770	0.490	0.320

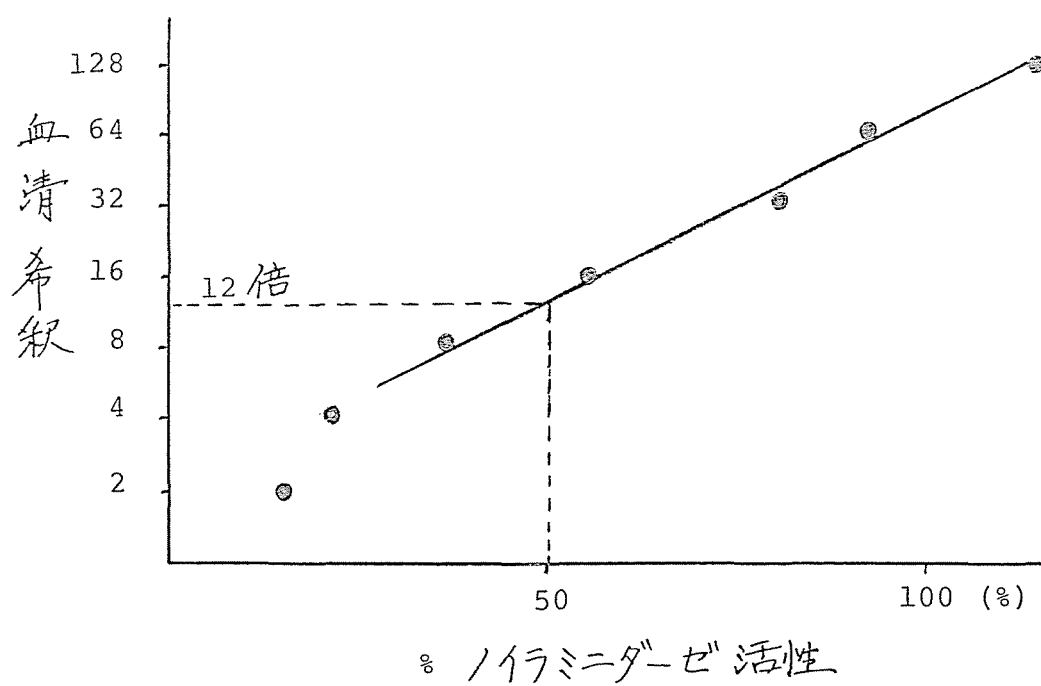


応して赤色を呈する。全試験管にブタノール試薬（*n*-ブチルアルコール 1,000 ml に濃塩酸 50 ml を加えたもの）を加えて激しく振盪し、ブタノール層にこの赤色を移した。これを 1,000 rpm 5 分間遠心し、その上清について波長 549 nm における吸光度を測定した。NA 試験列の吸光度からそれぞれ対応する希釈のウイルス対照列の吸光度を差し引いた値を、ウイルスの NA 活性にもとづく反応の吸光度とした。図 1-1 は各ウイルス希釈倍数毎のノイラミニダーゼ活性をその吸光度でプロットした例である。ウイルス希釈 1:2 から 1:128 において吸光度は 1.72 から 0.32 の範囲で直線的に減少した。この図から、吸光度 0.50 を示す抗原の希釈倍数を求めた。

NAI 試験には被検血清に加えて標準免疫血清と正常血清を用い、それらを生理食塩水で 2 倍階段希釈した。それぞれを 0.05 ml ずつ試験管に移して作った血清希釈列へ NA 活性測定の成績から 0.50 の吸光度を示すように希釈されたウイルス抗原を 0.05 ml 加えた。血清および抗原のかわりに生理食塩水 0.1 ml を加えた Fetuin 対照も作製した。これを 37°C の恒温槽中で 1 時間保温して抗原・抗体反応を行った。次に全試験管に Fetuin 混合液（Fetuin 溶液とリン酸緩衝液を等量混和したもの）を 0.1 ml 加え、37°C ふ卵器中で 18 時間反応させた。

図1-2 ノイラミニダーゼ抑制価の算出 (例)

	血 清 希 釈						
	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x128
被検血清	0.080	0.096	0.140	0.188	0.300	0.345	0.385
正常血清	0.556	0.442	0.372	0.332	0.270	0.370	0.330
% NA 活性	14.4	21.7	37.6	56.6	81.1	93.2	116.7



以後の発色の手順はNA活性測定法と同様に行った。NAI価算出の1例を図1-2に示した。すなわち、縦軸に血清希釈倍数、横軸には正常血清での吸光度に対する被検血清の吸光度の割合を各血清希釈倍数毎にパーセントで示した。パーセントNA活性は血清希釈度1:8から1:64において37.6%から93.2%の範囲ではほぼ直線的に増加した。そこで、本図から正常血清での吸光度と比較してNA活性を50%減少させる被検血清の希釈倍数を求め、この価をNAI価とした。この被検血清の例ではNAI価12倍である。

5. ウイルス分離

ウイルス分離はYAMANE et al⁷⁶⁾の方法に従い、発育鶏卵を用いて行った。分離材料はと殺豚の咽頭および気管の粘液で、これを棉棒を用いて採取し、199 Hanks 培養液 (pH7.2、1% 牛血清アルブミン2,000 U/ml ペニシリンG、2.5 mg/ml ストレプトマイシン、6 μ g/ml ゲンタマイシンおよび25 μ g/ml アンフォテリシンB 添加) 中に浸漬して-80℃に凍結保存した。分離に際しては検体を溶解したあと棉棒に付着している粘液を培養液中によく懸濁し、37℃恒温槽中で1時間静置した。上清を静かに注射器で採取し、その0.2 mlを10日齢発育鶏卵羊膜腔に接種し、35℃で72時間培養した。次に羊膜腔液を採取しそのHA活性の有無を調

HA活性の認められたものについてさらに羊膜腔で1代、尿膜腔で1代ないし2代継代した。分離されたウイルスはA型インフルエンザウイルスの核蛋白に対する免疫血清を用いたゲル内沈降反応、標準株に対する免疫血清を用いたHIおよびNAI試験によって同定した。

6. セファデクス G-200 による血清の分画

2 cm × 80 cm のカラムに PBS (pH 7.2) を用いてセファデクス G-200 を充填した。分画した血清サンプルはあらかじめトリプシン、過ヨウ素酸およびニフトリ血球によって上述の如く処理した。処理血清 (1:10 希釈) 2.0 ml をカラムにかけ、2.5 ml ずつ分画した。各フラクションについて蛋白量および10倍に濃縮したあとのHI活性を測定した。

7. 蛋白定量

Lowry et al³⁴⁾の方法にもとずき実施した。サンプル 0.2 ml に反応試薬 (0.1 N 水酸化ナトリウム溶液に炭酸ナトリウムを2%に溶解したものおよび0.5% 硫酸銅、1% 酒石酸カリウム溶液を50:1に混和したもの) 2.0 ml を加え、35°C の恒温槽中で10分間保温した。次に1N フェノール試薬 0.2 ml を加え、35°C で20分間保温して発色させた後、750 nm の波長における吸光度を測定した。牛血清アルブミン溶液で標準直線を作製し、牛血清アルブミン換算で蛋白量を表示した。

成 績

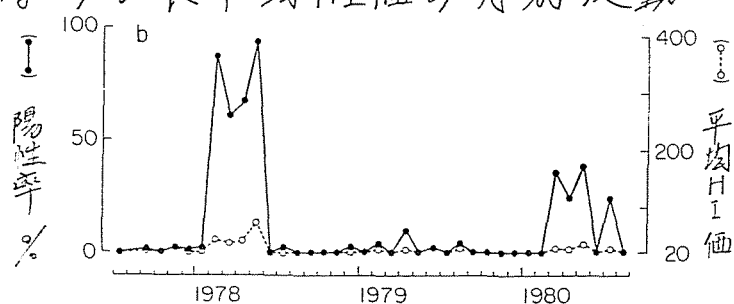
1. ブタにおける香港型インフルエンザの流行
 図1-3 a)は1977年7月から1980年8月までに仙台市食肉検査所に集められた宮城県下のブタ血清について、毎月50頭ずつを対象として香港型インフルエンザウイルス A/Victoria/3/75 (H3N2) 株を抗原としてHI抗体調査を行った成績である。黒丸はHI抗体保有率の月別変動を示し、白丸では陽性血清の抗体価の幾何平均値を示した。1978年2月から5月にかけて60ないし90%に達する高い抗体保有率が観察された。しかし、その後陽性例は減少し、1978年12月、1979年2月、4月、6月および8月にそれぞれ3例、2例、14例、1例および2例と散発的に検出されたのみであった。ところが1980年3月、4月、5月および7月にそれぞれ19/55 (35%)、12/50 (24%)、19/50 (38%)および11/50 (22%)と陽性例が増加し、流行の拡大する傾向が観察された。しかし、平均抗体価は全体に低い価にとどまっていた。1980年3月以降に得られたこれら陽性血清は宮城県のほぼ全域から検出され、宮城県下のブタの間には香港型インフルエンザが広く浸淫していたと考えられた。

2. ブタ型インフルエンザウイルスの出現

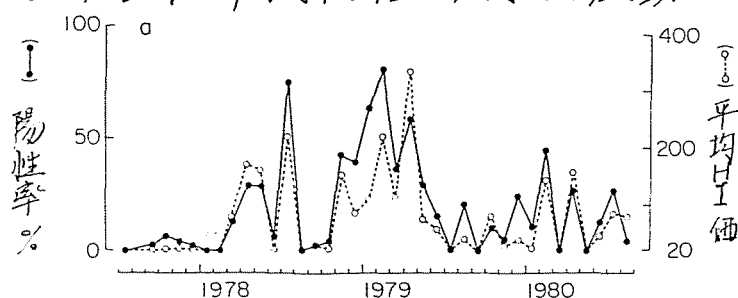
図1-3 b)は前節において用いたと同じ宮城県下

図 1-3 宮城県下のブタとヒトにおけるインフルエンザ流行の季節変動

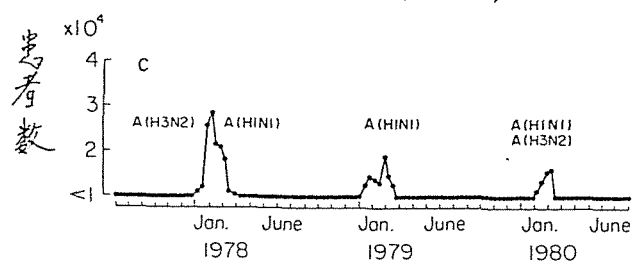
a) ブタにおける香港型インフルエンザHI抗体陽性率^{*}ならびに平均HI価の月別変動



b) ブタにおけるブタ型インフルエンザHI抗体陽性率^{*}ならびに平均HI価の月別変動



c) ヒト届出患者数の月別変動



* 抗体陽性率はHI価1:40以上を陽性として算出した。

のブタ血清についてブタ型インフルエンザウイルス A/New Jersey / 8 / 76 (H1N1) 株を抗原にして HI 抗体保有率および平均抗体価の推移を月別に示したものである。この集団においては 1977 年 9 月に初めて抗体陽性例が出現し、同年 12 月までに合計 12 頭の陽性例（陽性率 3.6%）が検出された。YAMANE *et al*⁷⁵⁾ が 1976 年 5 月に宮城県下のブタ 62 例を対象に行った調査では抗体保有率は香港型インフルエンザウイルス、A/東京/1/75 株に対しては 5%、また A/山梨/20/75 株に対しては 7% であったがブタ型インフルエンザウイルスに対しては全例陰性であった。このことから、宮城県下のブタの間でブタ型インフルエンザウイルスは 1976 年以降に侵入したと推定された。以後、1978 年 3 月から 7 月、11 月から 1979 年 6 月および 1980 年 2 月の合計 3 回、高い陽性率が観察され、流行の発生していたことが考えられた。特に 1979 年 2 月に得られた検体ではその 80% が陽性を示し、しかも陽性例における平均 HI 抗体価は 1:269 と極めて高い価を示した。このようにブタ型インフルエンザの流行もヒトにおけると同様に冬に流行が拡大するという季節変動を示す可能性が示された。さらに、2 回目目の流行拡大以後は陽性血清は流行間期にも持続的に得られ、ブタの間で endemic な感染の連鎖が形成されウイルスが保持されている可

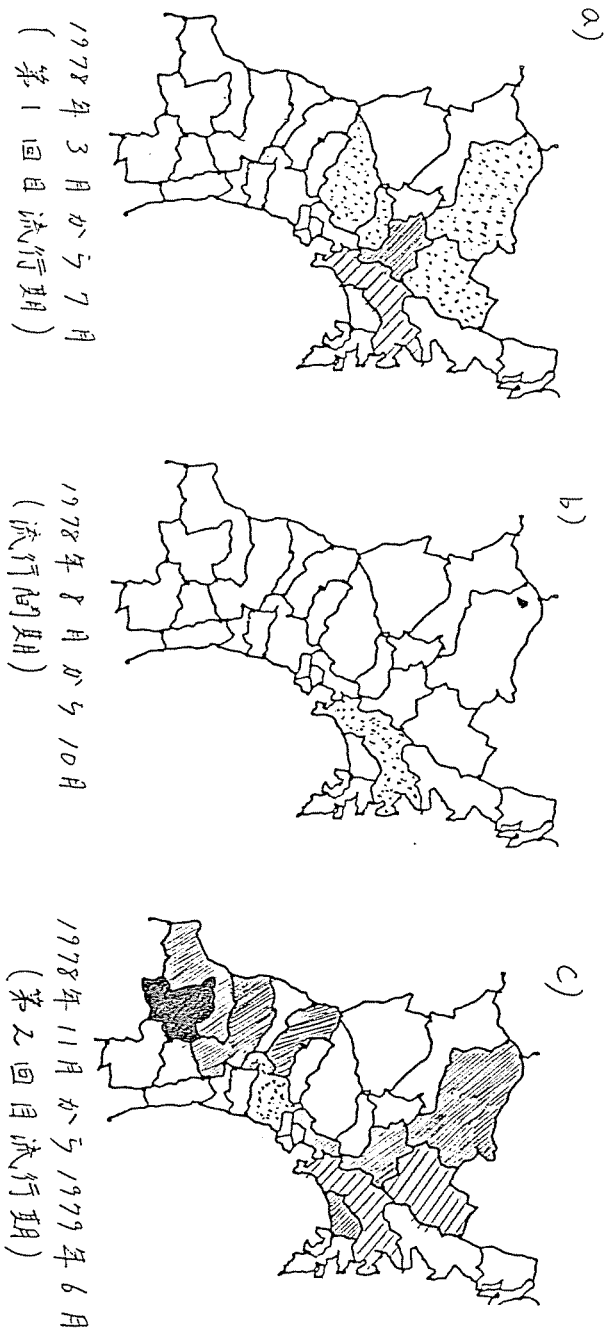
能性も示唆された。

以上のブタ型インフルエンザウイルスに対しての成績をと畜場で得られた検体の生産地別の陽性率を郡および市別に示したものが図1-4 a), b), c)である。第1回目の流行期(1978年3月から7月、図1-4-a)、流行間期(8月から10月、図1-4 b))および第2回目の流行期(11月から1979年6月、図1-4 c))の3期に分けて示した。第1回目の流行時には陽性血清は仙台市北東部の遠田と桃生両郡に集中しており、それぞれの郡での陽性率は40%と68%であった。続く流行間期にはほぼ全県にわたって検体の採取が行なわれたにもかかわらず、陽性例は桃生郡からのみ得られ(陽性率9.7%)、この地域のブタの間でのみブタ型インフルエンザウイルスによる流行が遷延していることが示された。しかし、第2回目の流行時にはほぼ全県にわたって高い陽性率が観察され、明瞭な地域差は認められなかった。

以上のように、宮城県下のブタの間に1976年5月以降にブタ型インフルエンザウイルスの侵入のあったことが確認され、2度の流行を経てその浸淫地域が全県にわたり拡大したことが明らかとなった。

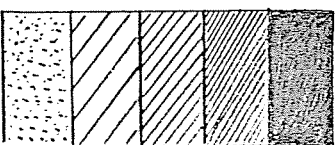
1977年7月から1978年7月まで総数881頭のブタの咽頭ぬぐい液からウイルス分離を試みた。そ

図1-4 宮城県下のブタのブタ型インフルエンザウイルスに対する
生産地別の陽性率



New Jersey株に対する陽性率

80% 以上	80% 未満
60% "	60% "
40% "	40% "
20% "	20% "
0% "	20% "



の結果、1978年4月の検体から発育鶏卵を用いて4株のインフルエンザウイルスが分離された。表1-2は分離ウイルス株のHA抗原を同定した成績である。ブタ型H1株としてA/New Jersey/8/76 (H1N1) 株およびA/swine/Iowa/15/30 (H1N1) 株、ヒトH1株としてA/FM/1/47 (H1N1) 株、さらに香港型H3株としてA/Victoria/3/75 (H3N2) の計4株を標準株とし、また、それらの株に対する免疫血清を用いた。新たにブタから分離された4株、A/swine/宮城/1/78、A/swine/宮城/2/78、A/swine/宮城/3/78 およびA/swine/宮城/4/78株はいずれもNew Jersey株およびIowa株に対する抗血清に対してホモの抗体価にほぼ等しい価を示した。しかし、FM-1株およびVictoria株に対する抗血清とは全く反応しなかった。表1-3は同じく分離株についてNA抗原を同定した成績である。用いた抗血清は、A/New Jersey/8/76 (H1N1) 株に対するものおよびA/equine/Prague/1/56 (H7N7) 株のHA抗原とA/Port Chalmers/1/73 (H3N2) 株のNA抗原を保有する遺伝的組換えウイルスに対するものである。New Jersey株に対する抗血清を使用する場合、抗原はNP-40で可溶化してから用いた(材料と方法、参照)。新たに分離された4株の抗原はいずれもH1N1という既存のブタ型インフルエンザウイルスと同じ組み合わせであった。

29 表1-2 ブタからの分離インフルエンザウイルスのHA抗原の同定

抗原	抗 血 清			
	A/New Jersey /8/76(H1N1)	A/swine/Iowa /15/30(H1N1)	A/FM/1/47 (H1N1)	A/Victoria /3/75(H3N2)
A/New Jersey/8/76(H1N1)	1,024	512	—	—
A/swine/Iowa/15/30(H1N1)	512	1,024	—	—
A/FM/1/47(H1N1)	—	—	1,024	—
A/Victoria/3/75(H3N2)	—	—	—	512
A/swine/Miyagi/1/78	1,024	1,024	—	—
A/swine/Miyagi/2/78	1,024	512	—	—
A/swine/Miyagi/3/78	1,024	512	—	—
A/swine/Miyagi/4/78	1,024	1,024	—	—

—: HI価 1:16 未満

表1-3 ブタからの分離インフルエンザウイルスのNA抗原の同定

抗 原	抗 血 清	
	A/New Jersey /8/76(H1N1)	A/Port Chalmers 1/73/(H3N2)
A/New Jersey/8/76(H1N1)	60	—
A/swine/Iowa/15/30(H1N1)	50	—
A/Victoria/3/75(H3N2)	—	900
A/swine/Miyagi/1/78	30	—
A/swine/Miyagi/2/78	50	—
A/swine/Miyagi/3/78	30	—
A/swine/Miyagi/4/78	60	—

—: NAI価 1:10 未満

以上のようにウイルス分離の成績からも宮城県下のブタの間にブタ型インフルエンザウイルスが存在することが確認された。

3. ブタ型および香港型インフルエンザウイルスの多重流行

表1-4は1977年7月から1978年7月にかけて得られたブタ型または香港型インフルエンザウイルスに対する陽性血清についてHI抗体価を測定した成績である。ブタ型インフルエンザウイルスとしてはA/Iowa/15/30 (H1N1) 株およびA/New Jersey/8/76 (H1N1) 株、香港型インフルエンザウイルスとしてA/愛知/1/68 (H3N2) 株、A/女川/1/73 (H3N2) 株、A/Victoria/3/75 (H3N2) 株およびA/Texas/1/77 (H3N2) 株の合計6株のA型インフルエンザウイルスを用いた。HI試験には低抗体価の検体においてもHAの抗原性の相違を明らかにするために抗原量をそれぞれ2HA価/0.025 ml にして実施した。

表に示す如く、これらの検体はHI試験法でブタ型インフルエンザウイルスに対してのみ反応する群 (Nos. 77462, 78158, 78249, 78334, 78337, 78349, 78469)、香港型インフルエンザウイルスに対してのみ反応する群 (Nos. 77303, 77362, 77450, 78287, 78298, 78379) およびブタ型と香港型のいずれのインフルエンザウイルスに対しても反応する群 (Nos. 77287, 77289, 78211, 78266, 78271, 78388, 78405)

表1-4 ブタ血清における香港型およびブタ型インフルエンザウイルス
に対するHI抗体測定成績

血清番号	(H3N2)				(H1N1)	
	A/愛知 /2/68	A/女川 /1/73	A/Victoria /3/75	A/Texas /1/77	A/swine/Iowa /15/30	A/New Jersey /8/76
77462	-	-	-	-	320	1,280
78158	-	-	-	-	160	640
78249	-	-	-	-	80	320
78334	-	-	-	-	160	320
78337	-	-	-	-	320	1,280
78349	-	-	-	-	80	320
78469	-	-	-	-	320	640
77303	320	640	160	640	-	-
77362	160	1,280	320	160	-	-
77450	80	1,280	160	80	-	-
78287	40	320	40	80	-	-
78298	-	80	640	160	-	-
78379	-	40	80	160	-	-
77287	40	320	40	80	40	80
77289	160	160	40	80	40	160
78211	-	160	80	40	160	640
78266	160	320	160	160	320	1,280
78271	-	40	80	160	80	320
78388	160	320	80	80	80	320
78405	-	40	40	160	40	160

—: HI価 1:40 未満

の3群に分けることができた。これらの検体は1977年から1978年にかけて同一期間に同じ県内で飼育されていたブタから得られたことから、宮城県下のブタの間にはブタ型および香港型の2種類のインフルエンザウイルスが同時に存在していたことが確認された。特に、第3群のブタは2つの異ったウイルス株に重複して感染したと考えられることから、2重感染の結果として遺伝的組換えウイルスの出現する可能性のあることが指摘された。

流行株の抗原性を類推するために、抗体陽性豚のそれぞれのA型インフルエンザウイルス株に対するHI価を比較した。ブタ型インフルエンザウイルスについてみると、陽性血清はいずれも1976年に分離されたNew Jersey株に対するHI価が1930年分離のIowa株に対するよりも高かった。このため、これらのブタはNew Jersey株類縁の抗原性をもつブタ型インフルエンザウイルスに感染したものと考えられた。一方、香港型インフルエンザウイルスに対しては1973年に分離されたA/女川/1/73 (H3N2)株に対して最も高いHI価を示す傾向が認められた。しかし、他の変異株に対しても比較的高い価を示し、血清学的には流行株の抗原性を特定することはできなかった。

4. 遺伝的組換えウイルスの出現

表1-5は1979年1月にある1つの農場から得られ

表1-5 1農場のブタ血清におけるHIおよびNAI抗体測定成績

血清番号	A/New Jersey/8/76(H1N1)		A/Victoria/3/75(H1N1)	
	HI 価	NAI 価	HI 価	NAI 価
17	160	-	-	3
18	640	-	-	9
19	320	-	-	32
20	160	-	-	-
21	320	-	-	14
22	1,280	-	-	3
23	320	-	-	-
24	320	-	-	10
25	320	-	-	5
26	-	-	-	-
27	320	-	-	3
28	320	-	-	13
29	80	-	-	7
30	640	-	-	8
31	640	-	-	3
32	640	-	-	38
33	80	-	-	5
34	320	-	-	12
35	1,280	-	-	3
36	320	-	-	9

—: HI 価 1:40 未満 または NAI 価 1:2 未満

た20検体についてHIおよびNAI抗体の測定成績をまとめたものである。HI抗体価についてみると、20検体中19検体がNew Jersey株のH1抗原に対して1:80以上の力価を示し、Victoria株のH3抗原に対してはいずれの検体も1:40未満の陰性であった。しかし、NAI試験ではHI抗体陽性になった19検体がNew Jersey株のN1抗原に対して1:2未満の陰性を示すにもかかわらず、Victoria株のN2抗原に対しては1:3から1:38の範囲で3例を除き陽性であった。以上の成績から、これら19検体のうち17例はH1N2という組み合わせの表面抗原をもつ遺伝的組換えウイルス株に感染したと考えられた。

表1-6は同じ検体について香港型インフルエンザウイルスの変異株（愛知株、サ川株、Texas株）、アジア型インフルエンザウイルス（A/RI/5⁺/57（H2N2）株）および1978年に神奈川県の大田から分離されたH1N2株（A/swine/1/78（H1N2）株）の合計5株を抗原にしてHIとNAI試験を行った成績である。また、1973年の流行株、Port Chalmers株についてはN2抗原に対するNAI抗体価のみを測定した。表1-5および1-6の成績から、香港型インフルエンザウイルスの変異株を用いたときは、愛知株とサ川株に対してそれぞれ1:40ないし1:80のHI価を示す検体がそれぞれ6例と9例得られたが、Victoria株とTexas株に対しては全例陰性であった。NAI

表1-6 1農場のブタ血清におけるHIおよびNAI抗体測定成績

	A/愛知/ 2/68 (H3N2)		A/ヤリ/ 1/73 (H3N2)		A/Texas/ 1/77 (H3N2)		A/RI / 5 ⁺ /57 (H2N2)		A/Sw/神奈川/ 1/78 (H1N2)		A/eq./Prague- A/P.C. (H7N2)
	HI	NAI	HI	NAI	HI	NAI	HI	NAI	HI	NAI	NAI
17	-	-	-	24	-	11	-	-	160	20	44
18	40	-	80	36	-	14	-	-	320	40	130
19	-	4	-	60	-	20	-	-	320	38	170
20	-	-	-	50	-	5	-	-	160	38	76
21	-	11	-	50	-	19	-	-	320	56	190
22	-	-	40	38	-	11	-	-	640	25	130
23	40	6	40	56	-	11	-	-	320	30	115
24	-	4	-	62	-	18	-	-	320	50	110
25	-	-	-	21	-	10	-	-	160	17	74
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	40	-	40	16	-	7	-	-	160	16	65
28	-	3	40	44	-	8	-	-	160	35	100
29	-	3	-	21	-	13	-	-	160	24	90
30	-	4	-	68	-	19	-	-	320	65	110
31	40	-	80	48	-	6	-	-	640	46	230
32	-	3	40	128	-	68	-	-	320	22	140
33	-	-	-	28	-	9	-	-	80	20	52
34	40	6	40	40	-	17	-	-	160	44	94
35	-	3	-	50	-	13	-	-	640	78	240
36	40	3	40	31	-	12	-	-	160	26	92

-: HI価 1:40 未満 または NAI価 1:25 未満

試験の成績では Port Chalmers 株と 女川株 という いずれも 1973 年の愛異株に対して高い力価を示した。神奈川株を抗原とした場合、HI 価は New Jersey 株とほぼ等しい力価を示し、NAI 価は Port Chalmers 株に比べるとやや低いものの女川株とほぼ等しい力価が得られた。RI/5⁺株を用いたときは HI と NAI の両抗体が全例において陰性であったことから、N2 抗体の検出がアジア型インフルエンザウイルス感染にもとずく交差反応でなかったことが確認された。

以上の成績からブタの間でブタ型インフルエンザウイルスと香港型インフルエンザウイルスの重感染が発生し、ブタ型インフルエンザウイルスの保有する H1 抗原と 1973 年に出現した香港型インフルエンザウイルスに類似した N2 抗原をもつ遺伝的組換えウイルスが出現し、それによる流行がこの農場で発生したことが推測された。

5. ブタにおけるヒト H1 型インフルエンザウイルスの感染

1977 年 12 月から 1980 年 8 月までに集められたブタ血清 1,814 例について FM-1 株と New Jersey 株を抗原としてヒト由来 H1 株の感染状況を血清疫学的に解析した。

HI 抗体陽性例は 1978 年 7 月に 2 例 (Nos. 356, 376)、9 月に 3 例 (Nos. 51, 67, 74)、1979 年 2 月に 1 例

(No. 54)、4月に5例 (Nos. 203, 214, 225, 291, 309) および6月に1例 (No. 428) 合計12例 (0.6%) 得られた。これら陽性血清の FM-1株と New Jersey 株に対する HI 試験の成績を表1-7 に示した。すなわちはじめの9検体においてはいずれも New Jersey 株に高い HI 価を示したのに対して FM-1株では 1:40 から 1:80 の低い価であった。このため、FM-1株に対する低力価の HI 反応は New Jersey 株類縁の HI 株の感染にもとずいて産生された抗体による交差反応によるものであらうと考えられた。また、続く2検体 (Nos. 51, 67) では FM-1株に対してのみいずれも 1:80 と低い HI 価を示したために、ヒト HI 株による感染か否かを確認できなかった。しかし、No. 74の検体は FM-1株に対してのみ 1:320 の高い HI 価を示したことからヒト HI 株による感染が強く示唆された。

この No. 74 の検体で認められた FM-1株に対する HI 反応が抗体によることを確認するために、セフアデクス G-200 カラムによるゲル濾過を行った。未処理血清を分画したときは広い範囲の分画に HI 活性が観察され、抗体による活性と非特異的赤血球凝集抑制物質による反応を区別出来なかった。そこで、検体をあらかじめトリプシンと過ヨウ素酸で処理して非特異的赤血球凝集抑制物質を除き、さらに、ニフトリ赤血球で非特異的赤血球凝集素

表1-7 ブタ血清におけるH1型インフルエンザウイルスに対する
HI抗体測定成績

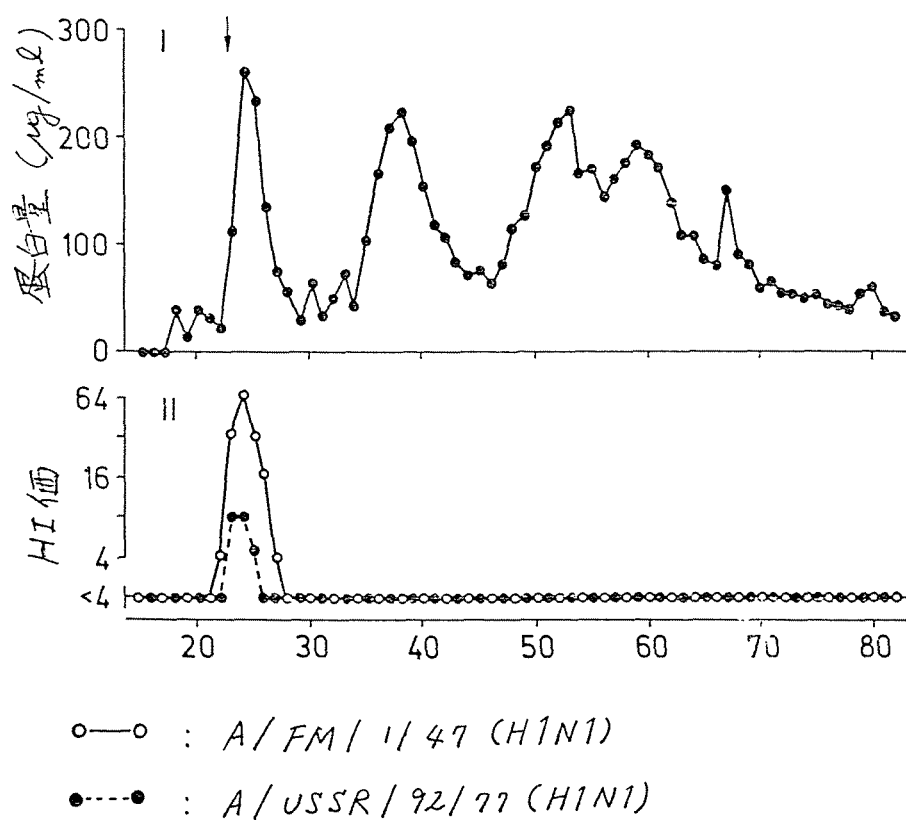
血清番号	抗 原	
	A/FM/1/47(H1N1)	A/New Jersey/8/76(H1N1)
356	80	1,280
54	80	1,280
203	80	1,280
214	80	640
225	80	640
291	40	2,560
309	40	1,280
428	80	1,280
376	80	160
51	80	< 40
67	80	< 40
74	320	< 40

を吸収してから分画した。図1-5は処理血清をゲル濾過したときの各分画の蛋白量とHI価を示したものである。HI用の抗原にはFM-1株に加えて、1977年からのヒト流行株A/USSR/92/77(H1N1)株を用い、感染株の抗原性の類推を試みた。HI活性は蛋白量の最初のピークに一致して認められた。そして、この活性が0.1Mの2-メルカプトエタノール処理で失活したことからIgM抗体によるものと考えられた。また、この分画を用いたHI試験の成績ではFM-1株はUSSR株に比べて8倍高いHI価を示し、むしろ古いタイプのH1株による感染であったことが示唆された。

6. ヒトとブタにおけるインフルエンザ流行の関連

ヒトとブタにおけるインフルエンザ流行の関連を探るために宮城県下で発生したヒトのインフルエンザ流行状況を毎月の届出患者数で示したものが図1-3c)である。流行はいずれの年においても冬期間に認められた。1977年から1978年にかけての流行では前半は香港型(H3N2)による流行であったが後半にはソ連型(H1N1)による流行が観察された。翌1979年にはH1N1株のみによる流行が起こり、ヒトにおけるA型インフルエンザウイルスの流行株は香港型インフルエンザウイルスからソ連型H1インフルエンザウイルスによって代わられた

図1-5 ヒトH1型インフルエンザウイルスに対する陽性ブタ血清のセファデックスG-200による分画成績



と考えられた。しかし、1980年には抗原的に独立したH1N1株とH3N2株が同一地域のヒトから分離され、2種類のシフト株による2重流行の発生が確認された。

一方、宮城県下のと場豚血清におけるNew Jersey株に対する抗体保有率は第2節で示したごとく、1978年3月から7月、11月から1979年5月および1980年3月の3回上昇し、ヒトにおけるインフルエンザ流行と同様冬期に発生する傾向がみられた。

同じブタ血清について香港型Victoria株を用いたときのHI抗体調査の成績では、1978年2月から5月にかけて流行の拡大が観察されたあとは散発的にしか陽性例は得られなかった。ところが、1980年3月以降、再び陽性例の増加する傾向が観察された。これを宮城県下のヒトでの流行と比較するとヒトで香港型インフルエンザの流行の認められた1978年と1980年の冬期にはブタの間でもVictoria株に対して陽性例の増加していたことが観察された。また、ヒトH1型インフルエンザの流行のみが発生した1979年には、ブタの間では極く少数の陽性例が得られたのみであった。このように香港型インフルエンザの流行についてみると、ヒトとブタの間で流行の時期や大きさに一致する傾向が多く認められた。

1980年5月に得たブタ血清から3例の香港型イ

ンフルエンザウイルスに対する陽性例が検出された。表1-8はこれら検体の香港型インフルエンザウイルスに対するHI抗体価とNAI抗体価を示したものである。HI試験には愛知株、女川株、Victoria株および山梨株の4株の香港型インフルエンザウイルスを抗原として使用した。愛知株を抗原としたときHI価1:40未満を示す検体が1例認められたが、他の株を抗原とした時は全て1:40以上のHI抗体価を示した。NAI試験ではNew Jersey株とPort Chalmers株を用いて、N1およびN2に対するNAI抗体価を比較測定した。N1に対してはいずれも1:2未満の陰性であったが、N2に対しては1:30、33および50の力価を示した。

以上のようにこれら3検体はHIおよびNAIの両試験によって香港型インフルエンザウイルスのH3とN2の両抗原に対する抗体を保有していたことが明らかとなり、香港型インフルエンザウイルスによる自然感染例であると判断された。さらに、HI試験の成績では、いずれの検体でもVictoria株に対しては1:80の力価を示したにとどまったが、1977年にヒトから分離された山梨株に対しては1:160、320および640と著しく高い力価を示した。これは最近分離されたヒト流行株に類似した株がヒトからブタに感染して浸淫していることを意味している。すなわち、宮城県下のブタとヒトとの間で

表1-8 香港型インフルエンザウイルスに対する抗体陽性例の
HIおよびNAI抗体測定成績

血清号	HI価				NAI 価	
	A/愛知 /	A/女川 /	A/Vic./	A/山梨 /	A/N.J./	A/P.C./
	2/68 (H3N2)	1/73 (H3N2)	3/75 (H3N2)	20/77 (H3N2)	8/76 (N1)	1/73 (N2)
880	40	40	80	160	< 2	30
882	< 40	40	80	320	< 2	33
886	80	160	80	640	< 2	50

A/Vic./,A/Victoria/; A/N.J./,A/New Jersey/; A/P.C./,A/Port Chalmers/;

極く最近 A 型インフルエンザウイルスの直接伝播の成立していた事実を示唆するものと考えられた。

考 察

宮城県で飼育されているブタについてインフルエンザの血清疫学的調査を行ったところ、香港型およびブタ型の二種類のインフルエンザウイルスの浸淫していることが明らかとなった。それらの流行は冬期に拡大してヒトにおけると同様の季節変動を示し、また、ヒト流行株と抗原的に極めて密接に関連したウイルスによるブタの感染が証明された。このため、ヒトにおけるインフルエンザ流行とブタにおける流行の関連性が強く示唆された。

香港型インフルエンザウイルスがヒトからブタへ伝播したことを示唆する報告はこれまでにいくつが知られている。KUNDID *et al*³⁰⁾ は1969年台湾においてヒトで香港型インフルエンザの流行が認められた翌年にブタの肺組織からヒト流行株と抗原的に全く区別出来ないウイルスの分離に成功している。また、英国で1968年から1970年にかけて行われたブタ血清中の香港型インフルエンザウイルスに対するHI抗体の測定成績では、ヒトでの流行に並行してブタの間での抗体保有率も上昇することが示されている¹⁷⁾。また、我が国において杉村ら⁶²⁾はブタにおける香港型インフルエンザの自然感染例を初めて報告し、ヒトの流行との関連性を

示唆している。本研究においても、ブタ血清の抗体保有率は1978年および1980年冬期に上昇し、ヒトでの香港型インフルエンザ流行と一致した傾向を示した。また、1979年冬期にもわずかながら陽性例が検出された。この年、宮城県下のヒトの間では香港型インフルエンザの流行は全く認められず、H1N1型インフルエンザウイルスによる流行のみであったことを考慮するとヒト流行株の潜在的な病原巣としてのブタの役割に注目する必要がある。加えて、1980年5月に得られた血清は1980年のヒト流行株に対して最も高い抗体価を示し、ヒトからブタ、またはブタからヒトへの直接伝播のあったことが強く示唆された。

1978年、HINSHAW et al.¹⁹⁾ はアメリカ合衆国のブタの間には遺伝的に異なる性状を持ついくつかの香港型インフルエンザウイルス株が同時に存在していることを明らかにした。また、香港では、1970年頃までに既にヒトの間から消え去った古い香港型インフルエンザウイルス — A/Hong Kong/1/68 (H3N2) — と同一の抗原性状を持つと考えられるウイルス株が1977年にブタから分離されている⁵⁶⁾。宮城県下のブタを対象にした血清疫学的調査でも陽性血清のなかには1980年のヒトにおける流行株に対してHI試験で最も高く反応するものが認められる一方、1973年の流行株の感染にもと

ずくことを示唆する血清も得られた。すなわち、
我國のブタの間にも香港型インフルエンザウイル
スと抗原的に類似したいくつかのウイルス株が存
在している可能性が考えられた。

宮城県下のブタにおけるブタ型インフルエンザ
の発生に関しては図1-4 および 1-6 で示される如
く、1977年中頃から A/New Jersey/8/76 (H1N1) 類縁
株によって流行が次第に拡大していく状況が明ら
かになった。我國においては1977年5月、新潟県
におけるブタ型インフルエンザウイルス分離の最
初の報告以来^{51,52)}、いくつかの県においてほぼ時
期を同じくして血清学的にブタ型インフルエンザ
ウイルス感染を裏付ける報告がみられている^{11,35)}。
世界的に見ても、従来ブタの間で香港型インフル
エンザの流行しか報告されていなかった国々にお
いても、1976年以降ブタ型インフルエンザウイル
スによる感染例が検出され始めているがそれらの
多くは米国からの輸入豚を介した持込によると云
われ、その広がりや速さが国際検疫上重要視され
ている²⁵⁾。

宮城県を中心にしたブタにおけるインフルエン
ザの疫学調査によって我國のブタの間にも香港型
とブタ型の二種類の異ったインフルエンザウイル
ス株が存在していることが明らかになった。さら
に、いずれのウイルスに対する抗体を保有してい

る血清も数多く得られたことから、それぞれの株による広範な流行によって同一個体で重感染(混合感染)の成立する機会があったものと考えられた。血清の採取されたブタはいずれも生後約6ヶ月から7ヶ月目のものであり、受動免疫の消失後に感染したとすると同時に2つの異った株で重感染する頻度はかなり高いものになると推察された。

1971年 WEBSTER *et al.*⁶⁸⁾ はブタを用いた香港型とブタ型インフルエンザウイルスによる重感染の実験によってHA抗原とNA抗原のそれぞれ異った組合せをもつ“組換えウイルス”が容易に出現することを示した。実際、我国のブタにおいても、本章で示したNAI抗体の調査成績や神奈川県のブタにおけるウイルス分離の成績から⁶³⁾、ブタ型H1N1株と香港型H3N2株の組換えウイルスと考えられるH1N2株の出現したことが明らかである。この事実がブタがヒト流行株のレゼルボアとしてのみならず、新型ウイルス出現のための遺伝的組換え現象の場として重要な役割を演じ得ることを示している。

ヒトH1型インフルエンザウイルスの起源を求めて多くの国々で各種の動物を対象にしてインフルエンザの感染調査が行なわれている。1978年ワシントンで開催されたインフルエンザの生貽に関する研究会において中国では血清学的調査によって種々の動物にH1株感染例が存在し、また、フラン

スではブタからヒトH1型ウイルスが分離されたという報告がなされた²⁵⁾。著者の成績でもブタにおいて1例ではあるが明らかなヒトH1型インフルエンザウイルス感染例が示された。しかし、現在までブタにおいてヒトH1型ウイルスによる流行の報告は得られていない。また、第2章で示す如くヒトH1株をブタに接種した場合でも感染を確認できなかった。以上のように、ブタのヒトH1型インフルエンザウイルスに対する感受性については不明な点が多く、ブタがレゼルボア動物となり得るかどうかについては詳らかでない。しかし、ブタ型インフルエンザウイルスあるいは香港型インフルエンザウイルスが広くブタの間で感染し、定着していく過程を検討した結果ではブタの間でもヒトH1型インフルエンザウイルスによる感染の発生する可能性が高く、今後、ブタにおける同型ウイルスの動向を監視する必要があると思われる。

第2章

カモ、ブタおよびヒトにおける
インフルエンザの流行

要 旨

カモからインフルエンザウイルスの分離を行ない分離株の性状を解析した。さらにブタ由来およびヒト由来ウイルス株と比較することにより、ヒト流行株の出現に際して他の動物由来ウイルスがいかなる関連を持ち得たかという点について考察を加えた。

カモからのウイルス分離は1976年から1981年までの5年間、合計2,076羽のカモを捕獲して行なった。41株のインフルエンザウイルスが分離され、そのHA抗原の種類は9種類、NA抗原の種類は6種類、またそれらの組合せは18種類にのぼった。この成績は我国に飛来するカモ集団においてインフルエンザウイルスが多数かつ多種類存在していることを示すものである。

検体のなかには2種類以上のHA抗原の存在を示すものがあり、これらのカモが複数のウイルス株に重感染したことが明らかになった。うち1例においては抗血清存在下のクローニングにより2株の異ったウイルスを単離することに成功した。これらの成績は、複数のウイルスの重感染の結果として、遺伝的組換えウイルスがカモの体内でも出現し得ることを示したものである。

1977年以降、カモからH1型インフルエンザウイ

ルスが多数分離された。そのHAの抗原性がブタ型H1インフルエンザウイルスと共通していることから、カモとブタという種を越えた動物間でウイルスが伝播する可能性を示唆するものとして注目された。特に、1977年に分離された26株のカモ由来インフルエンザウイルスのうちブタ型H1株は半数、13株にのぼった。それら13株のうちの9株は抗原的にも、また、遺伝的性状のうえからも均一なウイルス群であることが確認され、カモの集団においてH1株の流行の起ったことが明らかになった。

カモ由来H1株の性状をブタ由来H1株と比較すると、HAの抗原性には共通性がみられるものの、ウイルスRNAの電気泳動像は互いに大きく異なり、遺伝的に近縁なウイルスではないと考えられた。また、カモ由来H1株はヒト由来H1株とも抗原性に関連が認められるものの明瞭な隔たりが観察された。さらに、カモ由来、ブタ由来H1株およびヒト由来H1株を用いたブタに対する実験感染においても、ブタ由来H1株でのみ抗体価の上昇が認められたがカモ由来およびヒト由来株では抗体を検出できなかった。

このように、由来宿主を異にするH1株の諸性状の比較からは種を越えてのウイルスの直接伝播を示すことは出来なかった。しかし、多種類のウイルス、すなわち多数の遺伝子の貯蔵場所としての

野生の鳥類の役目については、今後にも更に研究する必要があると考えられた。

序 文

ヒト流行株の起源を知る目的から、ヒト以外の動物におけるインフルエンザの流行調査が多くの国々で世界保健機構(WHO)の計画のもとで行なわれた。その結果、多種類の脊椎動物、特に鳥類から多数のA型インフルエンザウイルスが分離された^{8,22)}。この計画以前にもインフルエンザの流行はニワトリ、アヒル、七面鳥などの家禽に存在することが知られていた⁶¹⁾。しかし、この計画によって野生の鳥類が最大のレゼルボアであることが明らかになった。

それら鳥類由来のウイルスのなかにヒト流行株と抗原的に近似したものが存在したことから、鳥類のインフルエンザウイルスがヒトの世界的流行株の出現に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。実際、A/Hong Kong /1 /68 (H3N2) 株の蛋白レベルおよび遺伝子レベルでの解析から香港型インフルエンザウイルスはアジア型インフルエンザウイルスとカモまたほウマ由来ウイルスとの間の混合感染の結果として、遺伝的組換によって生じたことが明らかにされつつある^{12, 32, 38, 39, 69)}。また、1976年以降、香港、カナダおよび西ドイツで捕獲されたカモから、ブタ型H1N1株の共通抗原をもつ株が分離された^{9, 18, 46)}。ほぼ時期を

同じくして、米国 New Jersey 州においてブタ型 H1N1 株による小流行が発生したことから、カモとヒトにおける H1N1 株出現の関連性が注目された³⁶⁾。

我国における家禽以外の鳥類を対象にしたインフルエンザの感染調査では、1977 年 NISHIKAWA et al.⁴⁴⁾ が東南アジアからの輸入鳥から数株の A 型インフルエンザウイルスを分離することに成功している。しかし、我国に飛来する野生の鳥類におけるインフルエンザ感染の実態は明らかにされていない。著者は WHO の計画にのっとり、1976 年以降、宮城県下に飛来する野生のカモを対象に感染調査を行ない、多数の A 型インフルエンザウイルスの分離に成功した。また、我国に渡来するカモの間にもブタ型 H1 インフルエンザウイルスが存在することも明らかにした。

本章では各種のカモから分離したウイルスについて、その抗原性と遺伝的性状を明らかにし、加えてカモ、ヒトおよびブタから分離され、互いに抗原性の類似している H1 型ウイルスについて、それらの抗原性、遺伝的性状ならびにブタに対する感染性についても検討した。

材料および方法

1. 野生のカモからの検体の採取

1976年から1981年までの5年間、11月から2月までの狩猟期間中に宮城県に飛来した野生のカモ（ガンカモ目ガンカモ科）から検体を採取した。カルガモ、マガモ、コガモ、ヨシガモ、オナガガモ、ヒドリガモおよびヒメハジロガモ、合計2,076羽から検体を得た。年度別および種類別の羽数は表2-1に示した。1977年から1978年に得られたカルガモ235羽のうち、57羽は同じ場所で1978年4月に得られたものである。総排泄腔および咽頭から綿棒でぬぐい液を採取し、抗生物質、牛血清アルブミンを含む199 Hank's培養液中に浸漬し、-80℃に凍結して保存した（第1章の材料および方法参照）。

2. ウイルス分離

第1章の材料および方法に述べた如く、10日齢胚育鶏卵羊膜腔内に検体を0.2 ml 接種して実施した。35℃、72時間培養のあと、羊膜腔液のHA活性を測定し、ウイルス感染の有無を確認した。

3. ウイルス

宮城県下に飛来する野生のカモから著者が分離したインフルエンザウイルスに加えて以下の3株のH1型インフルエンザウイルスを使用した。

表 2-1 捕獲力エの重量類および数

重量類	1976-1977	1977-1978	1978-1979	1979-1980	1980-1981	Total
留鳥						
カシカモ	334	235	90	37	91	787
渡り鳥						
マガモ	122	173	69	116	107	587
コカモ	5	52	34	26	3	120
ヨシカモ	8	35	39	8	0	90
オナカガモ	26	129	187	138	0	480
ヒドリカモ	0	7	0	0	0	7
ヒメビロカモ	0	0	4	1	0	5
合計	495	631	423	326	201	2,076

すなわち、1976年カナダでカモから分離された A/duck/Alberta/35/76 (H1N1) 株、1976年ヒトから分離された A/New Jersey/8/76 (H1N1) 株および 1978年宮城県下のブタから分離された A/swine/宮城/1/78 (H1N1) 株である。

4. ウイルスの精製

感染尿膜腔液を 3,000 rpm 30 分間遠心した上清を 30,000 rpm (日立 RP42 ローター) 60 分間の遠心でウイルスをペレットにした。ペレットを PBS に再浮遊させたあと、50% (w/w) から 10% (w/w) までの蔗糖密度勾配に乗せ 25,000 rpm (日立 RPS 27-2 ローター) 150 分間遠心し、白色のウイルスバンドを採取した。このウイルス液を PBS で 2 倍以上に希釈したあと、30,000 rpm (日立 RP42 ローター) 60 分間遠心し、再びペレットにした。このペレットを少量の PBS に再浮遊させ、使用まで -80°C で凍結・保存した。

5. 抗血清

A 型インフルエンザウイルスの核蛋白および既知の HA と NA 亜型に対する特異抗血清は、R. G. WEBSTER 博士 (St. Jude Children's Research Hospital TN USA) より分与された。特異抗血清作製に用いられた標準株名を表 2-2 に示した。著者の分離株に対する抗血清は、感染尿膜腔液をニワトリに静脈内接種することにより作製した(第

表2-2 抗血清作製に用いられた標準株名

抗原	株 名
"A" RNP	A/Victoria/3/75
H1	A/PR/8/34
H1	A/FM/1/47
H1	A/swin/Iowa/15/30
H2	A/Singapore/1/57
H3	A/Hong Kong/1/68
H3	A/equine/Miami/63
H3	A/duck/Ukraine/1/63
H4	A/duck/Czech/56
H5	A/tern/S.Africa/61
H6	A/Turkey/Mass./56
H7	A/equine/Prague/1/56
H7	A/FPV/Dutch/27
H8	A/turkey/Ontario/6118/68
H10	A/chicken/Germany/"N"/49
H11	A/duck/England/56
N1	A/New Jersey/8/76
N2	A/Singapore/1/57
N3	A/tern/S.Africa/61
N3	A/turkey/England/63
N4	A/turkey/Ontario/6118/68
N5	A/sheawater/Australia/72
N6	A/duck/England/56
N7	A/equine/Prague/1/56
N8	A/equine/Miami/1/63
N9	A/NW/C70/75

1 章、材料および方法参照)。

6. 血清学的診断法

1) 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

0.5%ニワトリ赤血球、マイクロプラスチックトレイを用いて実施した。4 赤血球凝集素価 (HAU) の抗原の赤血球凝集を完全に抑制する抗血清の希釈倍数を HI 価とした。使用抗血清はノウラミニダーゼ (receptor destroying enzyme: RDE、武田製薬株式会社) で処理し、非特異的赤血球凝集抑制物質を除いた。表 2-2 に示した各 HA 亜型に対する抗血清を用いて分離株の HA 抗原の亜型を同定した。

2) ノウラミニダーゼ抑制 (NAI) 試験

Fetuin (Spiro method, Gibco 社) を基質として、第 1 章に示した如く実施した。分離株の NA 抗原の同定には表 2-2 に示した標準株の各 NA 抗原亜型に対する抗血清を用いた。

3) ニ元免疫拡散 (IDD) 試験

IDD 試験用プレートは、ベロナール緩衝液 (ジエチルバルビツールナトリウム 10.3g およびジエチルバルビツール酸 1.84g を蒸留水 1,000 ml に溶解したもの) pH 8.6 にアガロース A-37 1.1%, サルコシル NL97 0.1% および窒化ナトリウム 0.1% を加え、加温溶解したものを 5×5 cm のガラス板に 3.5 ml (厚さ約 1.3 mm) 流し、冷却、固化して作製した。冷却後、直径 3 mm の穴をゲルにあ

けた。表2-2に示したA型インフルエンザウイルスの核蛋白および標準株のHAとNAの各抗原に対する抗血清を使用した。抗原は蔗糖密度勾配遠心法精製・濃縮したウイルスを使用した。非特異反応を防ぐため、血清および抗原にもサルコシルNL-97を0.1%加えた。穴へ抗原と血清を約10 μ lずつ入れ、湿箱中で37 $^{\circ}$ C、18時間反応させてから沈降線形成の有無を判定した。

7. 限界希釈法によるウイルスのクローニング

感染尿膜腔液をあらかじめPBSで10倍階段希釈したあと、感染尿膜腔液の原液のHA価を中和するに十分な力価の免疫血清を各々に等量混和し、37 $^{\circ}$ C、1時間保温した。それぞれ0.2 mlずつ5個の発育鶏卵尿膜腔に接種し、35 $^{\circ}$ C、48時間培養した。尿膜腔液の赤血球凝集能の有無で増殖を確認した。最大希釈でウイルスが増殖した尿膜腔液について、もう1度同様の操作をくり返しクローンウイルスとした。

8. 遺伝学的性状の解析

1) ウイルスRNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析

MDCK細胞を用い、20から40 μ Ci/mlのsodium- $[^{32}\text{P}]$ -orthophosphate存在下の培養液でウイルスを増殖させた。37 $^{\circ}$ C、48時間培養したあと、培養上清中のウイルスを蔗糖密度勾配遠心法により精

製、濃縮した。精製ウイルスからウイルス RNA を PALESE *et al* ^{47, 48)} の方法によりクロロフォルム・フェノールを用いて抽出した。次に 6M の尿素を含む 8% のポリアクリルアミドゲルで 120 V、15 時間泳動した。ゲルを乾燥させたあとオートラジオグラフによって RNA セグメントの泳動度を解析した。

2) 二次元電気泳動法によるウイルス RNA オリゴヌクレオチドの解析

中島 ⁴⁹⁾ の方法により実施した。すなわち、精製ウイルスから抽出したウイルス RNA を ribonuclease T₁ (三共株式会社、東京) で消化したあと、T₄ polynucleotide kinase (Boehringer Mannheim, West Germany) と [γ -³²P]-ATP (New England Nuclear, Boston, Mass.) を用いてその 5' 末端をラベルした。ラベルされたオリゴヌクレオチドを 6M の尿素を含む 10% ポリアクリルアミドゲルで pH 3.5 の条件下で泳動したあと、さらに 20% ポリアクリルアミドゲル pH 8.0 で泳動し、二次元電気泳動を行なった。オートラジオグラフによりオリゴヌクレオチドのフィンガープリンティング像を得た。

9. ブタに対する実験感染

実験感染には、ブタ、カモおよびヒトから分離された 4 株の H1 型インフルエンザウイルスを使用

した。ブタ由来H1株として A/swine/宮城/1/78 (H1N1)株、カモ由来H1株として A/duck/宮城/6/78 (H1N3)株および A/duck/宮城/13/78 (H1N4)株を、またヒト由来H1株として、A/宮城/21/78 (H1N1)株を用いた。実験に用いたブタは45日齢のHL種で、各ウイルス株について2頭ずつ使用した。これらのブタは接種ウイルス株に対して血清学的に陰性であることを実験開始前に確認した。

感染実験は $10^{7.0}$ EID₅₀/ml の感染尿膜腔液 3.0 ml を鼻腔内に接種することにより実施した。接種後、鼻腔および直腸ぬぐい液と血液を3週間目まで採取した。採取したぬぐい液について発育鶏卵を用いてウイルス分離を試み、また、血清中の接種ウイルス株に対するHI抗体の出現も調べた。

成 績

1. 野生のカモからのインフルエンザウイルスの分離

1) 分離状況

表2-1 は1976年から1980年の4年間に捕獲されたカモの数を種類別にまとめたものである。留鳥のカルガモ合計787羽、渡り鳥としてマガモ、コガモ、ヨシガモ、オナガガモ、ヒドリガモおよびヒメハジロガモ合計1,289羽、総数2,076羽が得られた。留鳥と渡り鳥との比は5:8で渡り鳥が多く捕獲された。

表2-3は年度別のインフルエンザウイルスの分離数をカモの種類別にまとめたものである。初めの2年間は、同一個体の総排泄腔(c)および咽頭(t)から別々にウイルス分離を試みた。

初年度は総排泄腔からのみ9株(分離率1.8%)分離された。2年目は、総排泄腔から23株(3.6%)、咽頭から7株(1.1%)分離され、総排泄腔からの分離率が咽頭からに比べ高かった。咽頭からウイルスが分離されたカモでは全て総排泄腔からも分離されたため、3年目以降は総排泄腔からのみウイルス分離を試みた。3年目は6株(1.4%)、4年目は2株(1.0%)、5年目は1株(0.5%)が分離され、分離率は次第に減少した。

留鳥と渡り鳥の間で分離率を比較すると、それぞれ15株(1.9%)と32株(2.6%)で有意の差は認められなかった。

カモの種類別の分離状況では、マガモから27株(4.6%)、カルガモから15株(1.9%)、コガモから3株(2.5%)およびオナガガモから3株のインフルエンザウイルスが分離された。ヨシガモ、ヒドリガモおよびヒメハジロガモからは分離されなかった。このため、同じカモの間でも感受性が相違することが示唆された。

2) 分離ウイルスのエンベロープ抗原の同定

既知のHAおよびNAの亜型に対する抗血清を用いたHIとNAI試験により分離ウイルスのエンベロープ抗原を同定した。

表2-4, 5は1976年から1977年にかけて分離された9株のインフルエンザウイルスのHA、NA抗原同定の成績である。その結果、分離は、H3N2、2株、H3N8、2株、H5N3、1株、H6N2、3株およびH6N8 1株と同定された。

表2-6は1977年から1978年にかけて分離された26株のインフルエンザウイルスのエンベロープ抗原同定の成績をまとめたものである。これらのうち13株は表2-6-aに示した如くH3N8 1株、H4N6 4株、H6N3、2株、H6N4、1株、H7N3、1株、H7N4、2株、H8N4、1株およびH11N4、1株と同

表2-3 カモにおける インフルエンザウイルスの分離状況

種 類	1976-1977		1977-1978		1978-1979	1979-1980	1980-1981	Total
	* T	** C	T	C	C	C	C	
留 鳥								
カルガモ	0	6	0	7	2	0	0	15
渡り鳥								
マカモ	0	2	7	13	2	2	1	27
コガモ	0	0	0	3	0	0	0	3
ヨシガモ	0	0	0	0	0	0	-	0
オナガガモ	0	1	0	0	2	0	-	3
ヒドリガモ	-	-	0	0	-	-	-	0
ヒメハジロガモ	-	-	-	-	0	0	-	0
合 計	0	9	7	23	6	2	1	48
	(0%)	(1.8%)	(1.1%)	(3.6%)	(1.4%)	(1.0%)	(0.5%)	(2.3%)

* T: 気 管 , ** C: 総排泄腔

表2-4 1976年と1977年に分離されたインフルエンザウイルスのHA抗原の
同定成績

抗血清		D-22	D-25	D-31	D-35	D-53	D-63	D-310	D-311	D-347
(株 名)										
H1	(A/PR/8/34)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	(A/FM/1/47)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	(A/sw./Iowa/15/30)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	(A/Sing./1/57)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	(A/Hong Kong/1/68)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	(A/eq./Miami/63)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	(A/duck/Ukraine/1/63)	-	512	-	1,024	-	-	128	128	-
H4	(A/duck/Czech./56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	(A/tern/S.Africa/61)	-	-	-	-	512	-	-	-	-
H6	(A/turkey/Mass./65)	128	-	512	-	-	512	-	-	1,024
H7	(A/eq./Prague/1/56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	(A/FPV/Dutch/27)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	(A/turkey/Ont./6118/68)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H10	(A/chicken/Ger./"N"/49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H11	(A/duck/Eng./56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

— ; HI価 1:32 未満

表2-5 1976年と1977年に分離されたインフルエンザウイルスの
NA抗原の同定成績

抗血清 (株名)	D-22	D-25	D-31	D-35	D-53	D-63	D-310	D-311	D-347
N1 (A/New Jersey/8/76)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N2 (A/Sig./1/57)	65	-	3,160	190	-	2,300	1,630	1,820	1,820
N3 (A/tern/S.Africa/61)	-	-	70	-	2,000	75	100	910	150
N3 (A/turkey/Engl./63)	-	-	-	-	1,520	-	-	-	-
N4 (A/turkey/Ont./6118/68)	-	120	-	370	-	-	-	-	-
N5 (A/sheawater/Aust./72)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N6 (A/duck/Engl./56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N7 (A/eq./Plague/1/56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N8 (A/eq.Miami/1/63)	470	1,050	1,320	-	-	-	-	-	-
N9 (A/NW/C70/75)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

— : NAI価 1:10 未満

定された。しかし、表ス-6-6 に示した残りの13株ではNA抗原については表ス-7に示した如く、NAI試験で同定されたが、HA抗原は既知のどのHA抗原亜型に対する免疫血清とも反応せず同定不能であった(表ス-8)。そこで、1976年 HINSHAW et al.¹⁸⁾ がカナダのカモから初めて分離したカモ由来H1型インフルエンザウイルス——A/duck/Alberta/35/76(H1N1)株——に対する免疫血清を用いてHI試験を試みた。表ス-9に示すように13株中12株はAlberta株に対する抗血清で明らかに抑制され、カモ由来H1株と同定された。D-3株はHI試験の成績からH3と同定されたが、IDD試験の成績からカモ由来H1株もそのなかに混合感染していることが示された。

以上のように、カナダのカモから1977年に初めてH1型インフルエンザウイルスが分離されてからほぼ時期を同じくして我国に飛来するカモの間にも抗原性の共通するウイルスの存在していることが明らかになった。しかし、著者の分離株のNA抗原はN3 またはN4 であり、Alberta株のN1とは異なったものであった。

Ds-2株は他の分離株のように冬期間中ではなく1978年4月に捕獲された57羽のカルガモのうちの1羽から分離された。

表ス-10およびス-11は、1978年から1979年にか

表2-6 1977年と1978年に分離されたインフルエンザウイルスの株数

a)	咽頭	経排泄腔
H3N8	0	1
H4N6	0	4
H6N3	0	2
H6N4	0	1
H7N3	0	1
H7N4	1	1
H8N4	0	1
H11N4	0	1
合計	1	12

b)	咽頭	経排泄腔
H?N2	1	0
H?N3	1	1
H?N4	4	5
H3 and H?N4	0	1
合計	6	7

22 表2-7 1977年と1978年に分離されたインフルエンザウイルスの
NA抗原の同定成績

抗血清	D-3	D-6	D-7	D-9	D-13	D-19	D-24	D-29	D-50	D-66	D-73	D-79	Ds-2
N1 (A/New Jersey/8/76)	60	80	50	-	100	300	70	30	60	60	-	70	40
N2 (A/Sing. /1/57)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-
N3 (A/tern/S.Africa/61)	-	11,000	-	20	-	-	-	-	11,000	-	-	-	-
N3 (A/turkey/Engl./63)	40	4,000	-	50	140	-	-	-	4,000	-	-	70	30
N4 (A/turkey/Ont./6118/68)	5,000	-	5,200	4,600	4,200	5,000	4,900	2,900	-	3,800	-	6,400	5,000
N5 (A/sheawater/Aust./72)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N6 (A/duck/Engl./56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N7 (A/eq./Prague/1/56)	-	-	-	-	70	-	-	-	-	-	-	30	60
N8 (A/eq./Miami/1/63)	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N9 (A/NW/C70/75)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: NAI価 1:10 未満

表2-8 1977年と1978年に分離されたインフルエンザウイルスの
HA抗原同定の成績

抗血清	D-3	D-6	D-7	D-9	D-13	D-19	D-24	D-29	D-50	D-66	D-73	D-79	Ds-2
H1 (A/PR/8/34)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1 (A/FM/1/47)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1 (A/sw./Iowa/15/30)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2 (A/Sing./1/57)	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3 (A/Hong Kong/1/68)	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3 (A/eq./Miami/63)	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3 (A/duck/Ukraine/1/63)	128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4 (A/duck/Czech./56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5 (A/tern/S.Africa/61)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6 (A/turkey/Mass./65)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7 (A/eq./Prague/1/56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7 (A/FPV/Dutch/27)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8 (A/turkey/Ont./6118/68)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H10 (A/chicken/Ger./"N"/49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H11 (A/duck/Eng./56)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

— : HI価 1:16 倍未満

表2-9 1977年と1978年に分離されたインフルエ
ンザウィルスのHA抗原の同定成績

分離株	血清
	A/duck/Alberta/35/76 (H1N1) 株
D-3	<32
D-6	512
D-7	2,560
D-9	5,120
D-13	10,240
D-19	320
D-24	5,120
D-29	2,560
D-50	128
D-66	5,120
D-73	2,560
D-79	2,560
Ds-2	5,120

て分離された6株のインフルエンザウイルスのHAとNA抗原同定の成績である。D-1、D-2およびD-14株はそれぞれH4N6、H9N3 およびH4N4と同定された。しかし、D-12についてはHA抗原はカモ由来H1型と同定されたがNA抗原は既知のいずれのNA抗原に対する抗血清とも反応せず、新しい亜型のNA抗原である可能性が示唆された。また、D-28とD-31株はHI試験でそれぞれ8種類および2種類の抗血清とも反応し、多種類のウイルスが混合感染しているものと考えられた。1979年から1980年にかけてはH1N4、H6N4の2株が分離された。1980年から1981年にかけてはH6N3 1株が分離された。

表2-12は1976年から1981年までの5年間に分離されたインフルエンザウイルスのHAとNA抗原の組合せをまとめたものである（1978年、D-28およびD-31株は複数の株の混合のため省いた）。HA抗原に関しては9種類、NA抗原に関しては6種類、その組合せは18種類であった。また、継続的に毎年分離される特定の亜型の組合せは認められず、カモのなかには多種多様の抗原の組合せを有するインフルエンザウイルスが同時に多数存在していることが明らかになった。しかし、ウイルスの分離数や分離率は次第に減少した。

3) 重感染個体からのウイルスの分離とクローニング

表2-10 1978年と1979年に分離されたインフルエンザウイルスの
HA抗原同定成績

抗 血 清		D-1	D-2	D-12	D-14	D-28	D-31
H1	(A/PR/8/34)	-	-	-	-	-	-
H1	(A/FM/1/47)	-	-	-	-	-	-
H1	(A/sw./Iowa/15/30)	-	-	-	-	-	-
H1	(A/duck/Alberta/35/76)	-	-	32	-	512	32
H2	(A/Sing./1/57)	-	-	-	-	256	-
H3	(A/Hong Kong/1/68)	-	-	-	-	-	-
H3	(A/eq./Miami/63)	-	-	-	-	-	-
H3	(A/duck/Ukraine/1/63)	-	-	-	-	128	-
H4	(A/duck/Czech./56)	64	-	-	256	64	-
H5	(A/tern/S.Africa/61)	-	-	-	-	-	-
H6	(A/turkey/Mass./65)	-	-	-	-	128	512
H7	(A/eq./Prague/1/56)	-	-	-	-	-	-
H7	(A/FPV/Dutch/27)	-	-	-	-	64	-
H8	(A/turkey/Ont./6118/68)	-	-	-	-	128	-
H9	(A/turkey/Wis./1/66)	-	512	-	-	-	-
H10	(A/chicken/Ger./"N"/49)	-	-	-	-	-	-
H11	(A/duck/Eng./56)	-	-	-	-	32	-

-: HI価 1:32未満

表2-11 1978年と1979年に分離されたインフルエンザウイルスの
NA抗原の同定成績

抗血清	D-1	D-2	D-12	D-14	D-28	D-31
N1 (A/New Jersey/8/76)	-	-	-	-	-	-
N2 (A/Sig./1/57)	-	44	-	-	-	44
N3 (A/tern/S.Africa/61)	20	460	-	-	-	880
N3 (A/turkey/Engl./63)	-	-	-	74	-	-
N4 (A/turkey/Ont./6118/68)	-	29	-	-	280	34
N5 (A/sheawater/Aust./72)	-	-	-	-	-	-
N6 (A/duck/Engl./56)	4,200	-	-	6,600	-	-
N7 (A/eq./Plague/1/56)	-	-	-	24	-	-
N8 (A/eq.Miami/1/63)	-	-	-	-	-	-
N9 (A/NW/C70/75)	-	-	-	-	-	-

—: NAI価 1:10 未満

表2-12 1976年から1981年までに分離されたインフルエンザウイルスの抗原同定の成績

1976-77	1977-78	1978-79	1979-80	1980-81
	H1N2			
	H1N3 H1N3			
	H1N4 H1N4 H1N4 H1N4 H1N4 H1N4 H1N4 H1N4		H1N4	
		H1N?		
H3N2 H3N2	H3N4			
H3N8 H3N8	H3N8			
	H4N6 H4N6 H4N6 H4N6	H4N6 H4N6		
H5N3				
H6N2 H6N2 H6N2	H6N2			
	H6N3 H6N3		H6N3	
H6N8	H6N4		H6N4	
	H7N3			
	H7N4 H7N4			
	H8N4			
	H11N4	H9N3		

1977年分離のD-3株にはカモ由来のH1型とH3型の2種類のHA抗原の存在していることがHI試験とIDD試験で示された。そこで、発育鶏卵を用いた限界希釈法によりそれぞれのウイルスを単離することを試みた。

抗H1血清または抗H3血清存在下で実施した2度のクローニングでそれぞれ1株のウイルスを得た。図2-1に、実施したIDD試験の成績を示す。クローニングを行っていないD-3は抗H1および抗H3血清のいずれとも明瞭な沈降線を形成した。抗H1血清存在下でクローニングされたクローン(cl.1)では抗H3血清に対して、また、抗H3血清存在下で得られたクローン(cl.2)は抗H1血清に対してそれぞれ明らかな単一の沈降線を形成した。さらに、クローン1および2を用いたHIおよびNAI試験により、それぞれのクローンはH1N4およびH3N4の2組の表面抗原の組合せであることが確認された。

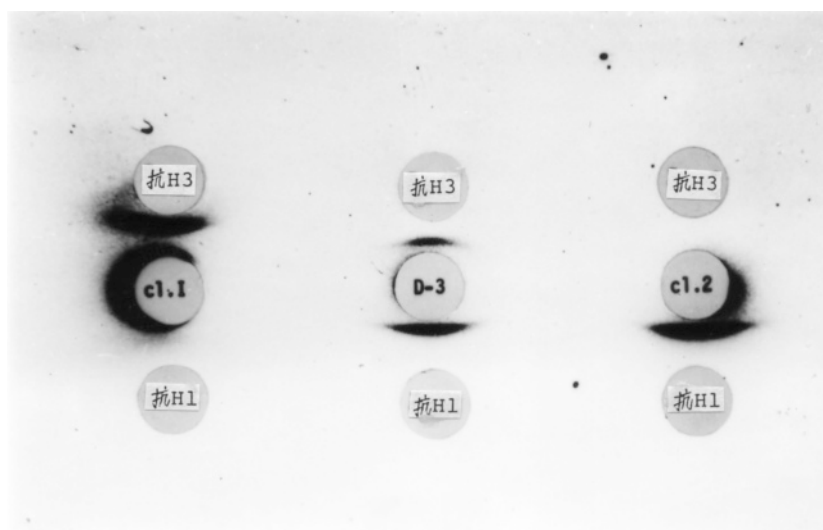
このことから、D-3は異なる2つのインフルエンザウイルスの混合物であることが明らかとなり、同一のカモに時間的にはば一致して重感染が起きたと考えられた。

2. ブタ、カモおよびヒト由来H1型インフルエンザウイルスの性状

1) 血清学的性状

ブタ、カモおよびヒト由来H1型インフルエンザ

図2-1 重感染個体からのウイルスのクローニング



ウイルスの性状をHI試験によって比較・検討した。得られたHI試験の成績を表2-13にまとめた。用いたウイルス株は1977年から1978年にかけてカモから分離されたH1N4株9株(D-7, 9, 13, 19, 24, 29, 66, 79 および Ds-2)、ヒト由来H1N1株(New Jersey 株)、ブタ由来H1N1株(SW-1株) およびカナダのカモ由来H1N1株(Alberta 株)である。それぞれの株に対する抗血清をニワトリで作製し、使用した。

カモ由来H1N4株ではいずれの株もそれぞれの抗血清の亦モの力価にはほぼ等しい力価を示した。このため、これらの9株はいずれも均一なHAの抗原性をもつと考えられた。Ds-2株は1978年4月に分離され、他の8株とは分離された時期において約半年間の隔りがある。しかし、その抗原性には明瞭な違いは認められなかった。

ヒト由来のNew Jersey 株、ブタ由来のSW-1 株とカモ由来H1型インフルエンザウイルスについてHAの抗原性を比較した。New Jersey 株とSW-1 株の間では抗血清の亦モの力価がそれぞれ1:1,024、1:4,096で、交差の程度から互いに等しい抗原性であった。しかしながら9株のカモ由来H1株は、New Jersey 株やSW-1 株に対する抗血清とはわずかに1:16 から 1:128 の交差を示したにすぎなかった。以上の成績から、カモ由来H1株とヒトあるいはブ

表2-13 カモ, ブタ およびヒト由来H1型インフルエンザウイルス
株間の交差HI試験

分離株	抗 血 清							
	D-9	D-19	D-24	D-79	Ds-2	New Jersey	SW-1	Alberta
D-7	256	256	256	256	1,024	64	64	128
D-9	<u>128</u>	256	128	256	512	64	32	64
D-13	128	256	256	128	512	32	16	64
D-19	128	<u>256</u>	128	256	512	64	32	64
D-24	128	256	<u>256</u>	256	512	64	64	128
D-29	128	256	256	256	1,024	64	16	128
D-66	64	256	128	256	256	64	64	64
D-79	128	256	128	<u>256</u>	512	64	32	64
Ds-2	256	256	256	512	<u>1,024</u>	128	64	128
New Jersey	32	128	32	64	256	<u>1,024</u>	1,024	32
SW-1	64	128	32	64	256	1,024	<u>4,096</u>	64
Alberta	64	128	64	64	256	64	64	<u>512</u>

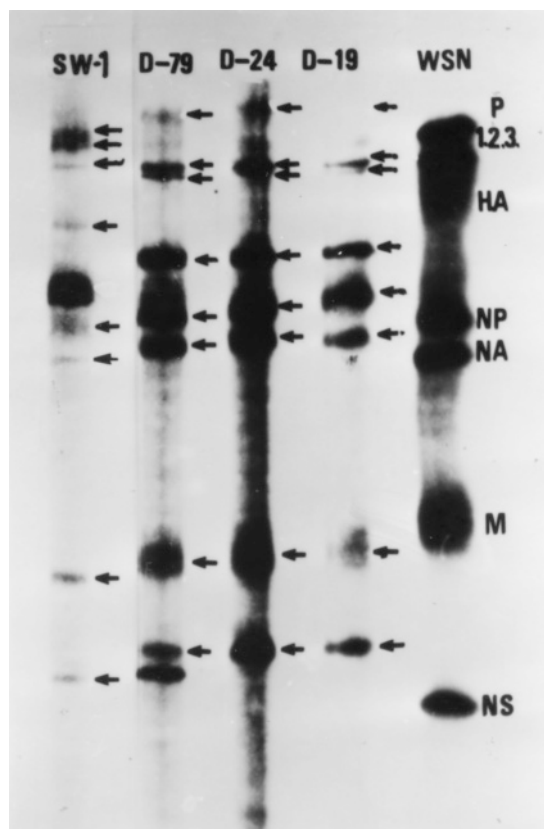
タ由来のH1株の間には、HAの抗原性に互いに交差反応が認められるもののかなりの隔たりのあることが確認された。

次に、1976年カナダでカモから分離されたH1型インフルエンザウイルス、Alberta株と比較した。Alberta株においても我国で分離されたカモ由来H1株と同様、New Jersey株およびSW-1株とは16分の1程度の交差が観察されるのみで抗原性に大きな相違が認められた。しかし、Alberta株は日本のカモ由来H1株との間においても2分の1ないし8分の1の交差を示し、ヒトおよびブタ由来H1株に対するよりは近似した抗原性を有するものの、既に明らかかな抗原性の相違も含んでいることが示された。

2) 遺伝学的性状

カモ由来H1株とブタ由来H1株を遺伝学的性状から比較するため、ウイルスRNAの各RNA分節の分子量を一次元電気泳動法によって解析した。図2-2にカモ由来H1株3株(D-19、D-24、D-79)、ブタ由来SW-1株および標準株としてWSN株の泳動パターンを示した。3株のカモ由来H1N4株は8本のRNA分節いずれにおいても一致した易動度を示した。図には示していないが他の6株のH1N4株も全く同一のパターンを示した。一方、ブタ由来のSW-1株とはその易動度に大きな違いがあり、特

図2-2 カモ由来およびブタ由来H1株のウイルス
RNAの一次元電気泳動像



に、HAをコードしていると考えられる4番目の分節においても明らかな違いが認められた。

さらに詳細な検討を加えるために二次元電気泳動法によりウイルスRNAのオリゴヌクレオチド分析を行なった。図2-3はD-19株(a)、およびD-24株(b) およびSW-1株(c)の泳動パターンを示したものである。D-19株とD-24株ではいずれも約150個のスポットを確認することが出来た。そのほとんど全てが同じ位置に認められ、この2株は遺伝的に非常に近似していると考えられた。しかし、SW-1株とは全く異なった泳動パターンを示し、共通のスポットを確認することは出来なかった。

以上のように、ブタ由来H1N1株とカモ由来H1N4株との間ではHAの抗原性においても若干の関連性がみられるものの、遺伝的には大きな相違のあることが明らかになった。

3) ブタに対する実験感染

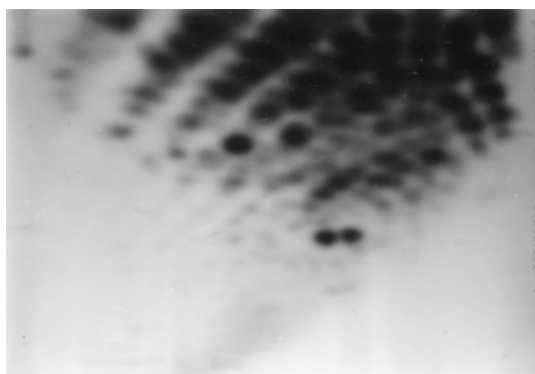
カモ、ブタおよびヒトという異なった宿主由来のH1型インフルエンザウイルスについてブタに対する感染性を比較した。

ブタ由来株として A/swine/宮城/1/78 (H1N1) 株、カモ由来株として A/duck/宮城/6/78 (H1N3) 株、A/duck/宮城/13/78 (H1N4) 株およびヒト由来株として A/宮城/21/78 (H1N1) 株を使用した。

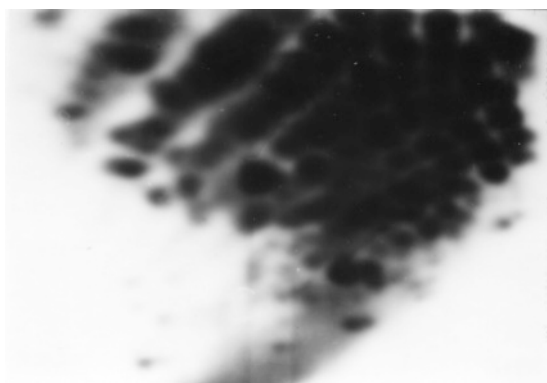
図2-4はA/swine/宮城/1/78 (H1N1) 株を用

図2-3 カモ由来およびブタ由来H1株のウイルス
RNAの二次元電気泳動像

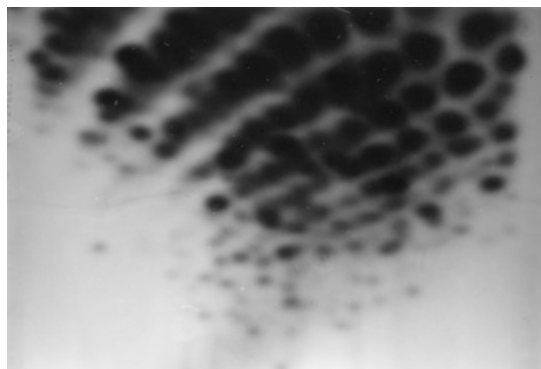
a.



b.



c.



いたときの成績である。ウイルス接種後の鼻腔からの経日的なウイルス分離の有無および接種ウイルスに対する血中HI抗体価の変動を示した。鼻腔からのウイルス回収は1頭は接種後4日目まで、もう1頭は5日後まで可能であった。血中HI価は6日目ないし10日目から出現し、1頭は7日目にもう1頭は10日目にHI抗体価1:320の最高値を示した。血中HI抗体価の明らかな上昇から、これら2頭はブタ由来H1型インフルエンザウイルスに感染したことが確認された。

図2-5は2株のカモ由来H1型インフルエンザウイルスをそれぞれ2頭のブタに接種したときの成績である。いずれのウイルス株においても、ウイルスの回収は接種後5日目まで可能であったが血中HI抗体価の上昇は確認できなかった。

ヒト由来H1型インフルエンザウイルス感染実験においては1頭にのみ接種し、他の1頭への同居感染の有無も調べた(図2-6)。しかし、ウイルスの回収が接種豚からのみ6日目まで可能であつただけで、同居豚からはウイルスが回収されず、また、いずれのブタにおいても血中HI抗体の出現は認められなかった。発熱、鼻汁、咳そう等の臨床症状はブタ由来H1型インフルエンザウイルス接種豚を含む全ての実験豚に認められなかった。

図 2-4 ブタ由来H1型インフルエンザウイルス—
A/swine/宮城/1/78 (H1N1)—のブタに
対する実験感染

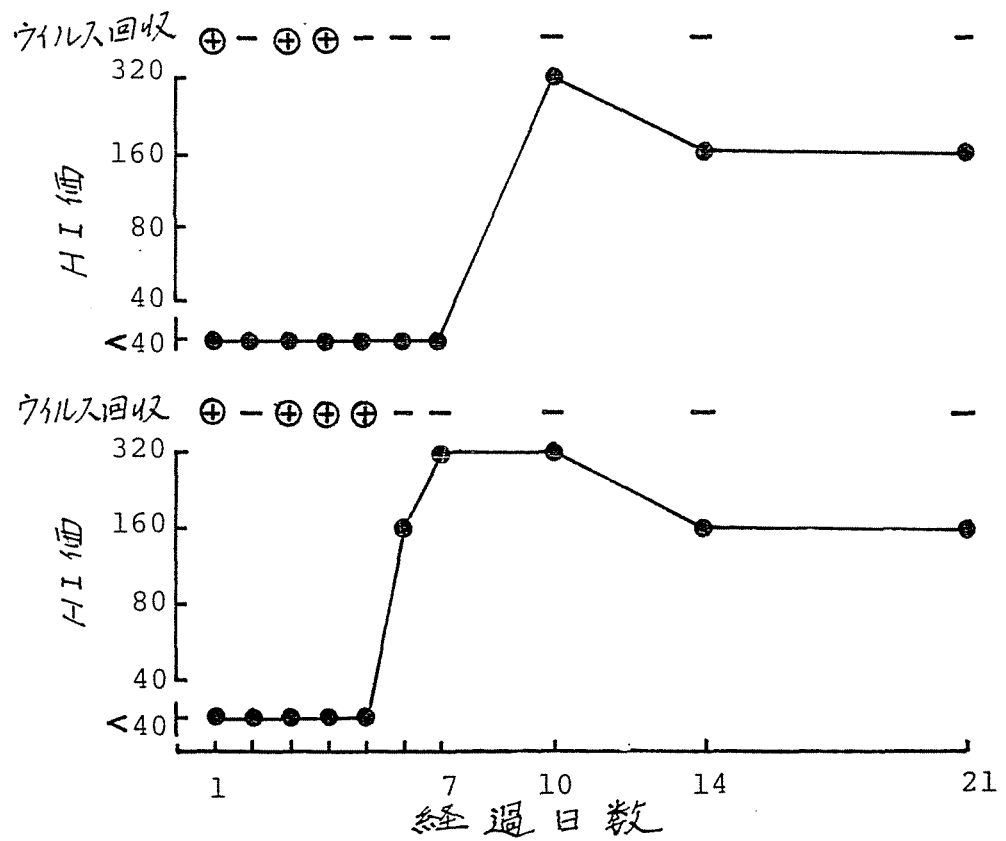
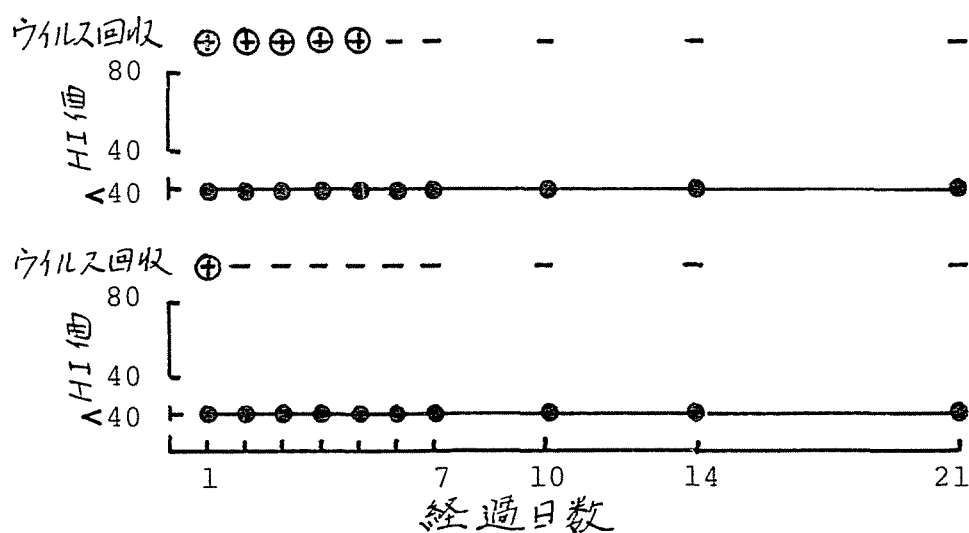


図 2-5 カモ由来 H1 型 インフルエンザ ウイルス—
A/duck/宮城/6/78 (H1N3) および A/
duck/宮城/13/78 (H1N4)—のブタに対
する実験感染

A/duck/宮城/6/78 (H1N3)



A/duck/宮城/13/78 (H1N4)

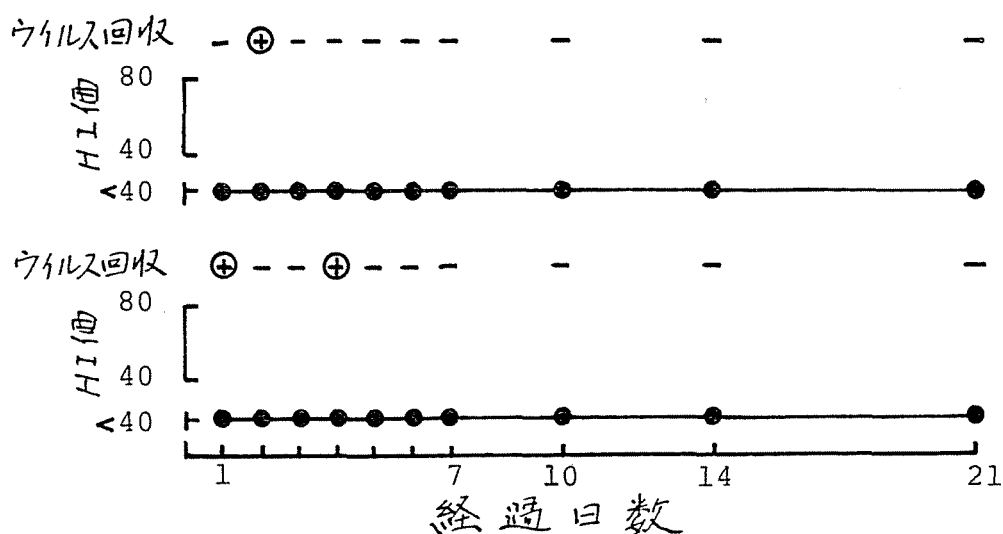
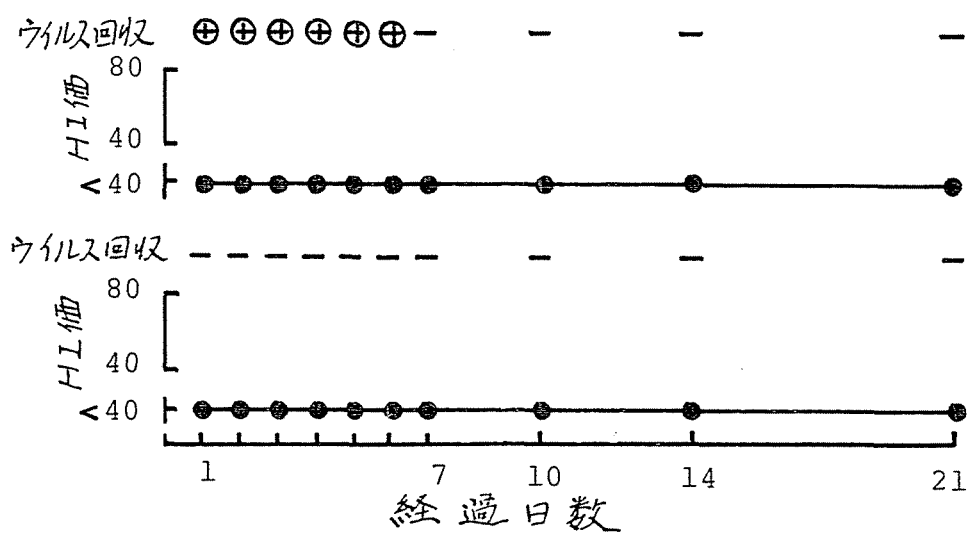


図2-6 ヒト由来H1型インフルエンザウイルス—
A/宮城/21/78—のブタに対する実験感
染



考 察

カモにおけるウイルスの分離成績から、我国に飛来するカモにも多数のインフルエンザウイルスが感染していることが明らかになった。

1976年から1978年にかけての2年間はウイルス分離を気管と総排泄腔の2ヶ所から試みたが、いずれの年も気管よりも総排泄腔から多数のインフルエンザウイルスが分離された(1976年、9株中9株、100%、1977年、26株中19株、73%)。この成績は WEBSTER *et al.*²⁷⁾ および KIDA *et al.*²⁹⁾ の報告にもあるように、ウイルスがカモの腸管で増殖し、長期間にわたって多量に糞中に排出されるという、カモにおけるインフルエンザウイルス感染の特徴を反映していると思われる。

我国ではカモの捕獲は毎年10月または11月から翌年の2月まで許可されるため、本研究で示した成績も極く限られた期間における結果である。このため、冬期以外で我国に生息する留鳥のカモのなかでインフルエンザウイルスがどのようにして維持されているのか不明である。しかし、1978年4月に害鳥駆除の目的から狩猟期間外に留鳥であるカルガモ57羽が捕獲され、調査することが出来た。そのなかの1羽からインフルエンザウイルスが分離され(表2-7、8、Ds-2株)、冬期間以外にも

留鳥のカモのなかでインフルエンザウイルスの保有されていることが示された。カモではインフルエンザ感染後も血中抗体価の産生が低く、かつウイルスが長期間排出されることが知られている^{29, 71)}。この性質から、インフルエンザウイルスは少数のカモによって長期間保持されることが可能であり、翌年飛来するカモが新たなインフルエンザウイルスを持ち込むとは別に、我国に生息するカモの間でもウイルスの感染環が継続されていると考えられた。

分離ウイルスのHAとNA抗原の亜型およびそれらの組合せは多種多様であった。5年間の調査ではHA抗原は9種類またNA抗原は6種類を数え、その組合せは18種類におよんでいる。このように我国に飛来するカモの間にも多種類のインフルエンザウイルスが同時に存在することが明らかになった。既に述べたように、カモは糞中に多量のウイルスを排出するため、多数のカモが集合する湖沼では多種類のインフルエンザウイルスが水中に混在していると考えられる。HINSHAW et al.²⁰⁾ は実際に、カモの生息する湖の水の遠心沈査からインフルエンザウイルスを分離することに成功し、また、そのウイルスが湖の水の中で22℃において4日間失活せずに生残することを示した。このような状況下では、インフルエンザウイルスはカモの間で経

口感染によって伝播され、かつ、重感染も容易に成立すると考えられる。著者の成績においても、1978年に得られた1検体(D-28)の中には8種類のHA抗原の存在が示され、また、1977年の分離株(D-3)からはH1N4とH7N4という異なった2つの株を単離することに成功した。これらの成績は複数のウイルスが同時に存在しているカモにおいては異なった株による重感染が自然界においても実際に起こることを示している。HINSHAW et al.²¹⁾はさらに、カモの糞から定量的にウイルスを回収して検索した成績から、多重感染の結果、遺伝的組換えウイルスがカモの体内で出現し得ることを明らかにしている。著者が5年間にわたって分離したインフルエンザウイルスの亜型の組合せは1年毎に大きく変化し、ある特定の組合せの株が毎年続けて分離されるといった規則性は認められなかった(表2-12)。この成績も、各種のA型インフルエンザウイルスがカモの中で重感染し、それらの間で遺伝的組換えが容易にかつ頻繁に起こることを表わしているのであろう。

カモから分離された株のHA抗原について特徴的なことは1977年から1978年にかけてブタ型H1株に関連した抗原をもつ、いわゆるカモ由来H1株が宮城県に渡来したカモの間に高率に出現したことである。これらのカモ由来H1株は咽頭と総排泄腔のい

ずれからも高率に分離され、この年に分離された26株のインフルエンザウイルスのうちの半数(13株)を占めていた(表2-6)。1976年カナダで HINSHW *et al.*¹⁸⁾ が、香港で BUTTERFIELD *et al.*¹⁹⁾ が、また後に1978年西ドイツで OTTIS *et al.*⁴⁶⁾ がいずれもカモから H1N1 型インフルエンザウイルスを分離している。これらに比べ、宮城県で分離された株はトリ由来の NA 抗原(N3 または N4) を組み合わせている点でユニークである。また、1981 年、鳥取県で Tsubokura *et al.*⁶⁷⁾ によっても H1N4 株が分離されたことから、我が国においてカモ由来 H1 株ではトリ由来 NA 抗原を組み合わせた株が主体になっている可能性がうかがわれた。

鳥類におけるインフルエンザの流行は、鳥類に対して病原性のある株の場合には病気の発生や帯死によって比較的容易に知ることが出来る。しかし、病原性の低い株による不顕性感染の場合は症状が認められず、特にカモの場合には感染しても抗体産生能が極めて低いことから²⁹⁾、ウイルス分離を広く試みる以外に流行を発見することは非常に困難である。著者の分離した9株の H1N4 株は、HA の抗原性や RNA 分析の結果から高い一致性が観察された。また、この年に分離された13株の H1 株のうちの9株までがこの H1N4 株であったことから、遺伝的に均一な H1N4 株がカモの間に不顕性流行を起こした

ことが示唆された。これは多種多様の株が混在しているカモの集団においてもある株が不顕性流行によって一時期優勢になり得ることを示している。

カモ由来 H1N1 株がブタから直接カモにもたらされたことを示す証拠は得られていない。しかしカナダ、香港および日本ではほぼ同時期に H1 型インフルエンザウイルスがカモから分離された^{9, 18, 79}。特に日本においては今までになく高い分離率であった（631 羽から 30 株分離、4.8%）。また、同年、米国 New Jersey 州で H1N1 株によるヒトでの小流行が観察され^{36, 37}、さらに我国のブタの間でも H1N1 株による流行が確認された^{11, 35, 51, 52, 78}。これらの疫学的状況から、H1 型インフルエンザウイルスが種を越えた伝播の結果、異なる宿主で同時に検出された可能性がある。特に、宮城県において H1 型インフルエンザウイルスの分離されたカモの捕獲された地域ではブタにおける H1 型インフルエンザ流行が最も早くから確認され、かつ、高い陽性率が認められていた^{4, 78}。そこで、ブタからカモまたはカモからブタへの直接伝播の可能性から、同一場所と時期に得られたカモ由来とブタ由来ウイルス株の性状の比較・検討が行なわれた。しかし、両者は表 2-12 に示した交差 HI 試験の成績から、互いに H1 型の共通抗原性を保有するものの亜型内で明瞭な差異 (antigenic drift) が認められた。また、

カモ由来H1株の抗原性は同じくカモから分離されたAlberta株に対して、ブタ由来株よりは近似しているもののやはり抗原性に違いが認められた。ブタ由来とカモ由来のH1株間のウイルスRNAの比較においても、図2-2に示した一次元電気泳動および図2-3~5に示した二次元電気泳動の成績で認められる如く、それらは明らかに異なる性状を示していた。このため、宮城県で分離されたカモ由来とブタ由来の2種類のウイルス株はカモとブタの間で直接伝播したのではないと考えられた。しかし、両者が共通の祖先から分れ、それぞれの宿主に適応したのかどうかを明らかにすることは出来なかった。

血清学的に共通抗原性を保持するカモ由来とブタ由来H1株についてそのHA遺伝子の性状を両株において比較した。一次元電気泳動法によるRNA分析では両株のRNA分節の易動度はHA蛋白をコードすると考えられる4番目のRNA分節も含めて全てのRNA分節で異なっていた。このため、それらの株間でHA遺伝子の遺伝的組換えは起っていないことが明らかになった。二次元電気泳動法による解析では8本のRNA分節全てと一度に泳動して行なったため、HA蛋白をコードしているRNA分節のみを対象にして両株と比較することは出来なかった。

ブタに対する実験感染は、カモ、ブタおよびヒ

ト由来H1株を用いて実施され、それぞれの株のブタに対する病原性が検討された。しかし、これらの株に対するブタの感受性は基本的には大きな相違は認められなかった。すなわち、どの株に対してもブタは明らかな臨床症状を示さず、また、鼻腔からのウイルス回収可能な期間の長短にも差はなかった。相違点はブタ由来株を接種したときにのみ血中HI抗体が産生されるが、他の株では産生されないことである。カナダ、香港および西ドイツで分離されたH1株でもブタに対する実験感染が行われているが、いずれでも接種後1週間程度鼻腔からのウイルス回収の認められるのみで、血中HI抗体の産生は認められないことが報告されている^{9, 18, 46)}。カモはカモ由来ウイルスを接種された場合、腸管でのウイルス増殖が認められるにもかかわらず臨床症状を示さず血中のHI抗体の産生や免疫応答が極めて低いことが知られている^{29, 71)}。さらに YODEN et al.⁸⁰⁾ はある種のカモ由来ウイルスをマウスに接種した場合、その血清は中和活性を示すもののHI活性は示さないことを報告している。それ故、ブタを用いた本研究においても、カモ由来やヒト由来H1株がHI抗体は検出されないものの、実際には感染した可能性が否定されたわけではない。

1980年、肺炎で斃死したアザラシから抗原的に

もまた遺伝的にもトリ由来と考えられるA型インフルエンザウイルス、H7N7株が分離された^{31, 72)}。これは、トリ由来ウイルスが哺乳類に対して強い病原性を示した初めての例として興味深い。今後、各ウイルス株間の異なった宿主に対する病原性についての検討が必要である。

第3章

ヒトにおけるA型インフルエンザの流行

要 旨

1977年から1978年にかけての宮城県下のヒトにおいて発生したインフルエンザ流行を血清疫学的ならびに分離ウイルスの抗原性をもとにして解析した。

宮城県下の住民420名から得られた咽頭ぬぐい液から88株のインフルエンザウイルスが分離された。このうちの56株がH3N2株で残りの32株は全てH1N1株であった。これらの分離ウイルスの抗原性状から、この年のインフルエンザ流行時期に宮城県の住民の間に2種類の異なったA型インフルエンザウイルスの存在していたことが確認された。

インフルエンザ流行前後に得られた50人の中学生の組血清による血清疫学的調査においてもH3N2株とH1N1株に対して有意なHI抗体上昇例がそれぞれ27%と66%認められ、H3N2株とH1N1株の2種類のウイルスによる2重流行のあったことが示された。

H3N2株に対して感染が確認された12例のうち5例はH1N1株に対しても抗体価の上昇が認められ、インフルエンザ流行期間中に異なった2種類のA型インフルエンザウイルス株による重感染のあったことが判明した。

1978年2月に得られたインフルエンザ様患者の

咽頭ぬぐい液から発育鶏卵を用いて抗血清存在下でウイルスのクローニングを試みたところ、H3N2、H1N1 およびH3N1 株の3種類のウイルス株の混在していることが示された。H3N2とH1N1株の間での組換型と考えられるH3N1株がヒトの体内で出現したものなのかあるいは発育鶏卵におけるウイルス分離の過程で生じたのかは不明である。しかし、異なる種類の異なる株による同時感染の発生していたことは明らかなることからヒト体内においてもブタやカモにおけると同様に重感染の結果として遺伝的組換ウイルスの出現し得ることが強く示唆された。

序 文

1977年以降、H1N1株がヒトにおける世界的な流行株として出現した⁸¹⁾。我国においても同年12月に千葉県下の患者からH1N1型ウイルスが初めて分離されて以来、流行は急速に拡大し、翌年3月までに全国的な患者の発生とウイルスの分離が報告されている⁶⁾。

ヒトにおける従来のA型インフルエンザウイルスによる流行では、新たなシフト株が出現した場合それまでの流行株がヒト集団から消え去ってしまうことが知られている¹³⁾。しかしながら、今回のH1N1株の出現に際しては従来から流行のくり返されていた香港型インフルエンザウイルスが消滅せずにそのまま存在した^{15), 26)}。さらに、YAMANE et al.⁷⁴⁾は宮城県における流行に際してこれらの全く異なる種類のA型インフルエンザウイルスが1つの集団内で同時に流行を引き起こしていたことを報告した。

本章ではヒトにおけるA型インフルエンザの流行史上初めて観察された異なる種類のシフト株による同時流行を、中学生の組血清における血清疫学的調査成績と患者からの分離ウイルスの抗原性の性状をもとに解析することを試みた。

材料および方法

1. ウイルス分離と同定

1977年から1978年にかけて宮城県下で発生したインフルエンザ様患者420名から急性期の咽頭ぬぐい液を得た。それらを棉棒を用いて採取し、第2章の材料および方法に示したようにHanks'培養液中に浸漬し、使用まで -80°C で凍結保存した。ウイルス分離は10日齢発育鶏卵羊膜腔またはMDCK細胞にぬぐい液を接種し、 33°C 、72時間培養して実施した。羊膜腔液もしくは培養液についてニワトリ赤血球に対する凝集の有無をスクリーニングし、血球凝集陽性例を尿膜腔で1代継代した後、その感染尿膜腔液について抗原性の同定を行った。エンベロープ抗原の同定は前述した方法によるHI試験およびNAI試験によって実施した。

2. 抗血清

分離ウイルスの同定に使用した抗血清はいずれも米国疾病管理センター (Centers for Disease Control, CDC) のDr. Kendal, A.P. より分与を受けた。HI試験にはA/USSR/90/77 (H1N1)、A/Texas/1/77 (H3N2) およびA/Victoria/3/75 (H3N2) 株に対する免疫家兔血清を使用した。血清中のHI抗体がウイルスのHA蛋白に結合するとNA蛋白の活性も同時に立体的に障害されることが知られ

ている。このため、分離ウイルスのNA抗原をNAI試験で同定する場合にはHAの抗原型がヒトには流行したことがないと考えられる馬由来のH7抗原をもち、NA抗原のみがヒト由来であるような遺伝的組換えウイルス株——A/equine/Prague/1/56 (H7) — A/USSR/90/77 (N1) および A/equine/Prague/1/56 (H7) — A/Port Chalmers/1/73 (N2) ——に対する家兎免疫血清を用いた。

3. 調査対象血清

調査に用いた血清は1977年12月（第2回目のインフルエンザワクチン接種時）および流行後の1978年3月の2回、仙台市内の中学1年生50名から採取し、組血清とした。

4. 血清学的診断法

HI抗体測定にはA/USSR/90/77 (H1N1) および A/Texas/1/77 (H3N2) 株を抗原として用い、マイクロプレート法で実施した。NAI抗体測定には0.1% NP40 で可溶化したA/宮城/85/78 (H1N1) および A/Texas/1/77 (H3N2) 株を抗原として使用した。術式はいずれも第1章に述べた如くである。

5. 限界希釈法によるウイルスのクローニング

クローニングは第2章の材料および方法に記したと同様の方法で実施した。抗血清としてはNAI試験に用いた遺伝的組換えウイルスに対する2種類の抗血清に加えて、A/Texas/1/77 (H3N2) 株の

H3抗原と A/equine/Prague/1/56 (H7N7) 株の N7 抗原を保有する遺伝的組換えウイルスに対する抗血清および A/FM/1/47 (H1N1) 株より単離精製した H1抗原に対する抗血清を使用した。これらの抗血清のうち2種類を組み合わせるクロージングを実施した。

成 績

1. 分離ウイルスの性状

1977年12月から1978年3月までに得られた420名の咽頭ぬぐい液から発育鶏卵接種によって29株またMDCK細胞によって59株、合計88株のインフルエンザウイルスが分離された。

エンベロープ蛋白の抗原解析によって56株がA/Texas/1/77株類似の香港型インフルエンザウイルスまた残りの32株がA/USSR/90/77株類似のH1型インフルエンザウイルスと同定された。HI試験およびNAI試験による各株のエンベロープ抗原同定成績の一部を表3-1に示した。

このように、1977年から1978年にかけて宮城県下の住民におけるインフルエンザの流行はH1N1株とH3N2株という抗原的に異なった2種類のA型インフルエンザウイルスによって引き起こされていたことが明らかにされた。

2. 中学生における血清学的調査

今回のヒトにおけるインフルエンザの流行を血清疫学的に解析するためにインフルエンザの流行期間の前後に中学生50名を対象にして採血し、これらの組血清について抗体価の変動を検討した。

図3-1-Aは香港型インフルエンザウイルスA/Texas/1/77株に対するHI抗体価の分布の推移を

表3-1 分離A型インフルエンザウイルスのHA、NA
抗原同定成績

株 名	抗 血 清			
	抗 H1	抗 N1	抗 H3	抗 N2
A/宮城/43/78(H1N1)	640	1,100	-	-
A/宮城/48/78(H1N1)	640	110	-	-
A/宮城/50/78(H1N1)	1,280	2,400	-	-
A/宮城/52/78(H1N1)	640	390	-	-
A/宮城/53/78(H1N1)	1,280	400	-	-

A/宮城/51/78(H3N2)	-	-	1,280	7,200
A/宮城/55/78(H3N2)	-	-	1,280	1,800
A/宮城/56/78(H3N2)	-	-	640	490
A/宮城/57/78(H3N2)	-	-	2,560	1,380
A/宮城/58/78(H3N2)	-	-	1,280	200

一: HI価 1:16 未満 または NAIV価 1:10 未満

示したものである。破線は4倍の抗体価の変動を表わしている。44例中12例(27%)において初期血清よりも後期血清で4倍以上の抗体価の上昇がみられた。平均抗体価は1977年12月に得られた血清において1:145倍であったが1978年3月の成績では1:247倍と約1.7倍の力価の上昇が観察された。

図3-1-Bは同じくTexas株のN2に対するNAI抗体価の変動を示したものである。標準血清を用いたときのNAI抗体価の反復測定成績では、最大変動誤差が50%であったことから組血清での有意抗体変動を3倍とした⁷⁾。破線は3倍の変動を示している。43例中13例(30%)に有意の抗体上昇がみられた。このときの平均抗体価は1977年12月で1:23倍、また1978年3月では1:38倍であった。

次にH1型インフルエンザウイルスA/USSR/90/77株に対する抗体価の変動について検討した。図3-2AはH1抗原に対するHI抗体価の3ヶ月間の分布の推移を示したものである。1977年12月においては全例1:16倍未満の陰性であった。しかし、1978年3月には33名が1:32倍以上の抗体価を示し、3倍以上の抗体上昇率は66%に達した。また、このときの平均抗体価は1:46倍であった。

図3-2Bは同じくN1に対するNAI抗体価の分布の推移を示したものである。48名中27名(56%)に有意の抗体上昇が認められたが、流行後の平均

図3-1 香港型インフルエンザウイルス A/Texas/1/77 株
に対する抗体価の分布の推移

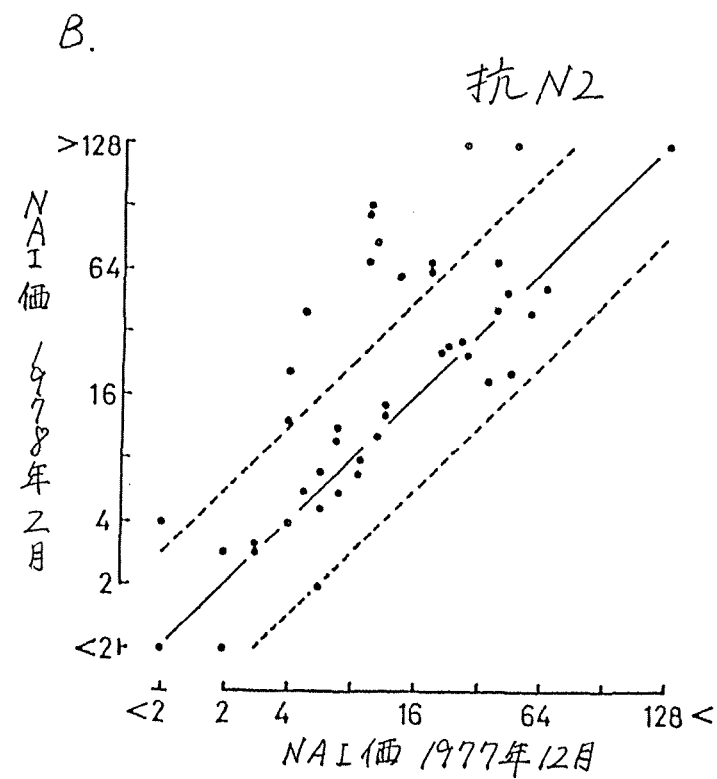
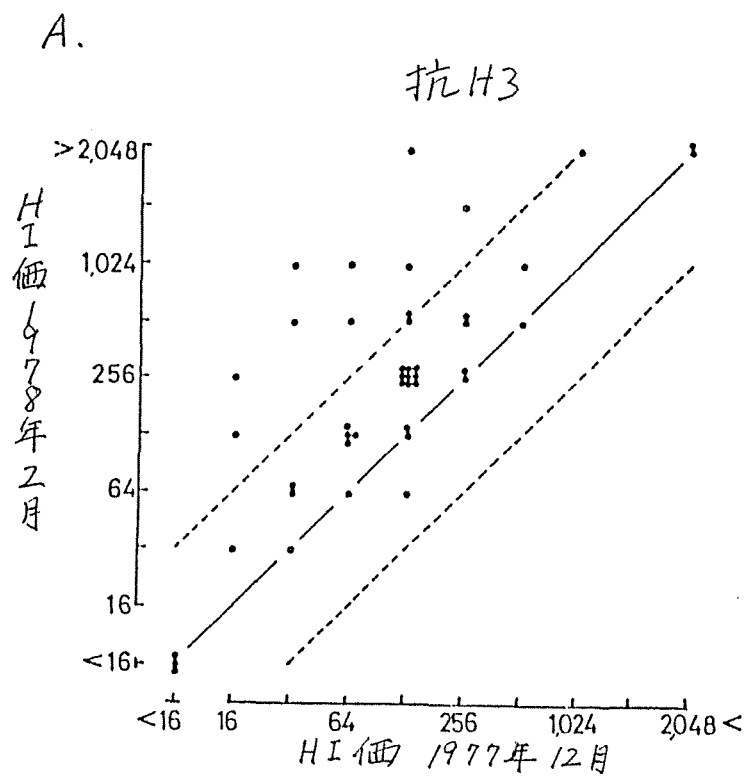
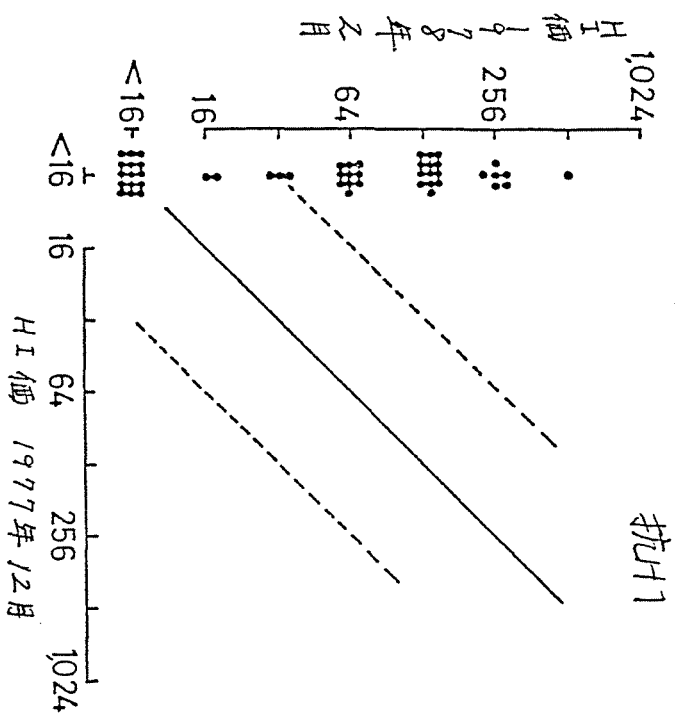
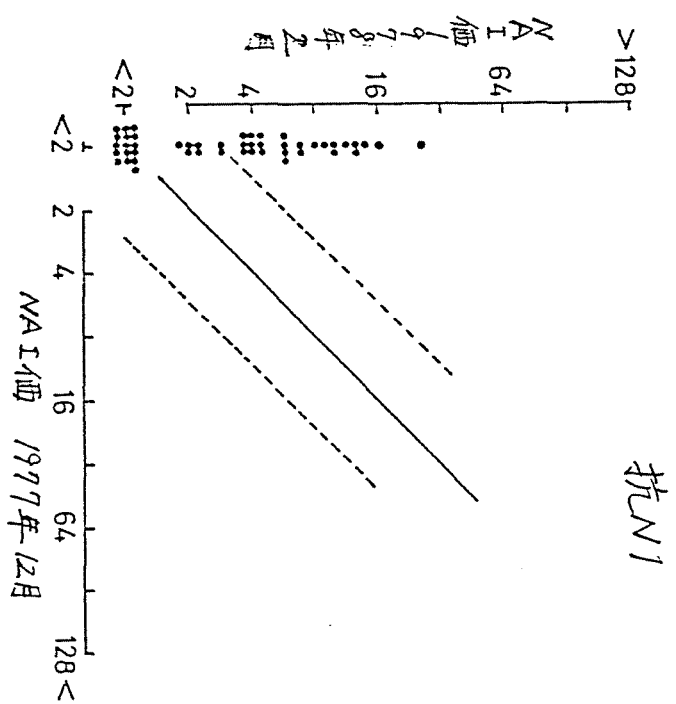


図 3-2 H1型インフルエンザウイルス A/USSR/90/77株
に対する抗体価の分布の推移

A.



B.



抗体価は低く、1:4.8 倍にとどまっていた。

以上のように、集団レベルにおける流行の解析から、1977年から1978年にかけての宮城県下の住民におけるA型インフルエンザの流行は香港型(H3N2)とH1型という二種類のシフト株による重流行であったことが明らかとなった。

調査された検体44例のうち香港型インフルエンザウイルスに対する抗体価の変動が流行前後でHI試験で4倍以上、またはNAI試験で3倍以上の上昇を示したものが14例(32%)検出され、香港型インフルエンザウイルスの感染が疑われた。表3-2は香港型インフルエンザウイルスおよびH1型インフルエンザウイルスに対するそれぞれ検体の抗体価をまとめたものである。14例中11例(グループI、II)はH3N2株のHAとNAのいずれの抗原に対してもそれぞれ4倍と3倍以上の抗体上昇が認められ、H3N2株の感染が確認された。さらに、これら11例のうちの5例(グループI)はH1およびN1抗原に対しても有意な抗体価の上昇がみられ、1977年12月と1978年3月の二回の採血時の間にH3N2株とH1N1株の二つの株に感染していたことが示された。残りの3例については(グループIII)、症例第9においてH3、H1およびN1の3抗原に対するみ抗体上昇がみられたことから本例はH1N1型の感染のあったことが推定された。しかし、H3N2株に

ついてはH3に対する抗体価の上昇が認められたのみで感染の確定は出来なかった。症例第16では、N2抗原に対してのみ抗体上昇がみられ、H3に対する抗体価は1977年12月においてすでに1:2,048倍以上であった。しかし、この症例はこの表には示さなかったが1977年7月の時点ではH3抗原に対してHI抗体価は1:16倍であったことから、1977年12月の採血以前に感染し、HI抗体に遅れてNAI抗体価の上昇がみられたH3N2株感染例であろうと考えられた。また、H1とN1の両抗原に対してはいずれも陰性であった。症例第27はN1とN2の両ノイラミニダーゼ抗原とのみ反応し、HI抗体の有意上昇はみられなかった。H3抗原に対しては1:64倍から1:128倍に抗体価が2倍上昇したもののN2抗原に対してはNAI価は1:4倍と低く、感染ウイルスの抗原型の同定は出来なかった。

3. 遺伝的組換えウイルスのクローニング

1978年2月、かぜ様症状を呈した14才の女性の咽頭ぬぐい液からインフルエンザウイルスA/宮城/7/78株が分離された。分離ウイルスは発育鶏卵羊膜腔で1代と尿膜腔で1代、合計2代継代された後H1N1株と同定された。しかし、さらに1代尿膜腔で継代された後に得られたウイルスの抗原型はH3型に変化していた。そこで、この検体はH1N1株とH3N2株の二重感染例と考え、発育鶏卵に

表3-2 H3N2, H1N1株感染症例の血清診断

症例	抗H3		抗N2		抗H1		抗N1	
	1977年 12月	1978年 3月	1977年 12月	1978年 3月	1977年 12月	1978年 3月	1977年 12月	1978年 3月
I								
13	64	512	11	90	-	128	-	4
14	16	256	20	70	-	128	-	8
24	1,024	>2,048	58	>128	-	64	-	4
28	32	1,024	4	13	-	128	-	3
29	128	1,024	14	60	-	256	-	6
II								
15	16	128	4	22	-	16	-	-
18	256	2,048	10	70	-	-	-	-
25	64	1,024	28	>128	-	-	-	-
26	128	512	5	43	-	-	-	-
31	128	>2,048	10	120	-	-	-	-
50	32	512	10	128	-	-	-	-
III								
09	128	512	6	2	-	128	-	7
16	>2,048	>2,048	20	64	-	-	-	-
27	64	128	-	4	-	-	-	4

一: HI価 1:16未満 抗NAI価 1:2未満

よる継代2代目の検体にH1、N1、H3あるいはN2に対する抗血清を加え、それぞれホモのウイルスを中和した後生残ウイルスを限界希釈法によって単離した。

表3-3は抗血清存在下または非存在下で3回の限界希釈法を用いた継代によって単離された4つのウイルスクローンのHAとNAの抗原型を同定した成績である。クローン1、2および4はそれぞれ抗H3N2血清、抗H1N1血清および抗H1N2血清の存在下で得られたものである。それらのクローンのHAおよびNAの抗原型はいずれも加えた抗血清に対してヘテロの組合せで、それぞれH1N1、H3N2およびH3N1の抗原型を有していた。また、抗血清を加えずに限界希釈法で継代した場合でもクローン3に示すようにH3N1株が単離された。しかし、抗H3N1血清存在下では予想されるヘテロの組合せであるH1N2株も含めてクローンを得ることが出来なかった。

このように、1人の患者のぬぐい液から2種類のHAと2種類のNA抗原の組合せで3種類のウイルスが分離された。このため、この患者は少なくとも2種類の異なるウイルス株による重感染例であると判断された。

この検体の得られた患者の急性期と回復期の血清における抗体変動を調べたものが表3-4である。

表3-3 限界希釈法によって単離された4クロー
ンのHAおよびNA抗原の同定成績

	HI 抗体価		
	A/Texas/1/77 (H3N2)	A/Victoria/3/75 (H3N2)	A/USSR/90/77 (H1N1)
clone 1 (H1N1)	<16	<16	2,048
clone 2 (H3N2)	640	128	<16
clone 3 (H3N1)	640	128	<16
clone 4 (H3N1)	640	128	<16
A/Texas/1/77 (H3N2)	<u>1,280</u>	256	<16
A/Victoria/3/75 (H3N2)	160	<u>512</u>	<16
A/USSR/90/77 (H1N1)	<16	<16	<u>1,024</u>

	NAI 抗体価	
	A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	A/USSR/90/77 (H1N1)
clone 1 (H1N1)	<10	600
clone 2 (H3N2)	400	<10
clone 3 (H3N1)	<10	900
clone 4 (H3N1)	<10	500
A/Texas/1/77 (H3N2)	1,280	<10
A/Victoria/3/75 (H3N2)	200	<10
A/USSR/90/77 (H1N1)	<10	<u>900</u>

HIとNAI試験の成績から、H3とN2抗原に対する抗体価の上昇が観察され、香港型インフルエンザウイルスによる感染が確認された。しかし、A/USSR/90/77(H1N1)株に対する抗体は検出されなかった。

表3-4 急性期および回復期血清における抗体変動

	HI 抗体価		
	A/Victoria/3/75 (H3N2)	A/Texas/1/77 (H3N2)	A/USSR/90/77 (H1N1)
急性期	64	16	<16
回復期	256	128	<16

	NAI 抗体価	
	A/Texas/1/77 (H3N2)	A/USSR/90/77 (H1N1)
急性期	4	<2
回復期	64	<2

考 察

1977年以後、H1型インフルエンザウイルスが出現し、ヒトではそれまでの流行株である香港型インフルエンザウイルスとH1型インフルエンザウイルスによる同時流行が世界的に報告されている¹⁵⁾。宮城県におけるインフルエンザの流行は1977年12月から翌年3月にかけて、前半は香港型また後半はH1型インフルエンザウイルスを主体にして発生したことが報告されている^{3,74)}。

本章で示したウイルス分離の成績では、88株の分離株のうち56株が香港型インフルエンザウイルス、残りの32株がH1型インフルエンザウイルスであった。また、中学生を対象にした血清疫学的調査成績においても香港型とH1型インフルエンザウイルスに対して流行後に明らかな抗体価の上昇を示す例が多数認められた。特に、本研究で対象にした中学生はこれまでにH1株に対して全く暴露された経験がなく、また、予防接種も使っていなかった。すなわち、この年齢層はH1株に対して極めて高い感受性を有していたためにその流行も急速に進行して短期間で高い抗体保有率(66%、50例中33例)を獲得したものである。このように1977年の宮城県におけるA型インフルエンザの流行は香港型とH1型による二重流行であったことがウイ

ルス分離と血清疫学的調査の成績から明らかにされた。

ブタや野生の鳥類においては多種類かつ多数のA型インフルエンザウイルス株が同時に同一集団内に保有されていることが知られている^{4, 18, 22, 79)}。さらに、その結果として複数のウイルスがある自然宿主に同時感染した結果として遺伝的組換えウイルスが頻繁に出現することが知られている¹⁹⁾。本章で示した血清疫学的調査においても香港型インフルエンザウイルス感染と考えられた12例のうちの5例はH1型インフルエンザウイルスに対しても抗体価の上昇が観察された。組血清の採取時期がインフルエンザ流行期間をはさんで3ヶ月間隔しているために、これらの例が互いの異なる株に同時感染したのかあるいは時期を違えて感染したのかは不明である。しかし、このときの流行は1978年1月下旬から2月下旬までのわずか1ヶ月間に大部分が集中して発生し³⁾、しかもこれらの血清は1つの中学校という閉鎖集団から得られている。加えてH3株もしくはH1株に対する感染の確認された40例のうち5例(12.5%)という高い頻度で2種類の株に対して感染の認められたことから、重感染の機会はずっと高かったものと推察された。

1978年、KENDAL et al.²⁵⁾はアメリカ合衆国Wyomingにおけるインフルエンザの流行に際して1名

の高校生から H3N2、H1N1 および H3N1 という異った亜型の組合せをもつ3種類のインフルエンザウイルスを分離することに成功した。本研究で示した成績でも、1名の患者の咽頭ぬぐい液から同じ組合せの3種類のインフルエンザウイルスが分離されたことから、これらの患者においては香港型とH1型インフルエンザウイルスによる同時感染が成立していたと判断された。今回、分離材料からクローニングによって単離されたウイルス株にはアメリカでの報告と同様、感染株と考えられる H3N2 株と H1N1 株の外に抗原亜型の新たな組合せを有する H3N1 株が含まれていた。この新たな亜型ウイルスがヒト体内において H3N2 と H1N1 株の間での組換えの結果出来たものなのか、あるいは分離過程で発育鶏卵内で出現したものなのかは不明である。しかし、発育鶏卵での2代継代によって H1N1 型を示していた腺体が抗血清を加えずにさらに2回、限界希釈法で継代することによって、表4-3のクローニングに示されるように抗原亜型が H3N1 型に変化していた。すなわち、発育鶏卵において増殖する能力が他の抗原亜型の組合せの株に比べて最も高いと考えられた。一般に、複数のインフルエンザウイルスを発育鶏卵や培養細胞に重感染させた場合、2種類の HA 抗原を保有するような表現型の混合 (phenotypic mixing) したウイルス

株が高頻度に出現する。この株はいずれの抗原に
対する抗血清によっても中和されるために抗血清
存在下でクローニングした場合、目的とするヘ
ロの抗原のみを有する株の分離率は非常に低下
することが知られている⁶⁴⁾。しかし、抗血清存在下
でのクローニングでH1N1株だけが単離されなかつた
理由は不明である。また、これらの抗原亜型の組
合せと発育鶏卵における増殖性の相違がヒトに対
する病原性と対応しているか否かも明らかでなく、
今後の研究が必要な点である。

重感染の疑われた患者の血清学的解析ではH3N2
株の感染の起ったことを証明し得たが、H1N1株に
対しては発症後4週間目に得られた回復期血清に
おいてもHAとNAの両抗原に対する抗体は検出され
なかった。図4-2で示したように、中学生の組血
清における血清疫学的調査ではH1N1型ウイルスの
感染ではH3N2型感染に比べ抗体価の低いものが多
かった。この患者も年齢は14才でH1型に対しては
初感染であったため免疫応答が低く、抗体産生が
十分でなかった可能性が考えられた。

これらの成績はヒトにおいても複数のA型イン
フルエンザウイルスが同時に散布された場合には
ブタやカモの集団におけると同様に重感染が容易
に成立し、遺伝的組換えウイルスも出現し得るこ
とを示すものと思われる。

従来、インフルエンザウイルスの感染防御にはHI抗体が重要な役割を果たすと考えられ、我国では精製HA蛋白によるコンポーネントワクチンが製造され、広く用いられている¹⁴⁾。このため、ヒトに於けるインフルエンザ流行の血清疫学的調査や分離ウイルスの抗原性の解析にも専らHI試験が行われてきた。しかし、本研究で示したように複数のA型インフルエンザウイルスが1つの集団内で流行を起こすような場合には、遺伝的組換えウイルスも出現し得ることから、新しい組換え型ウイルスの出現については十分な監視体制をとる必要がある。このためにHAのみならずNAに対する抗体測定や抗原同定により、より詳細に流行を解析する必要があると考えられた。

総 括

これまでヒトにおけるA型インフルエンザの流行は抗原性の全く異なるシフト株が約10年の周期をもちて出現することによって絶えることなく引き起こされてきた。しかしながら、このシフト株出現の機構や起源については不明な点が多く、的確な予防法を講ずることが困難である。

最近、シフト株がヒトと動物のインフルエンザウイルス間での遺伝的組換えによって出現するという仮説が提唱された。著者はこの仮説をもとにして、宮城県下のヒト、カモおよびブタにおけるインフルエンザ流行を血清疫学的およびウイルス学的に解析し、ヒトと動物における流行の関連性を検討した。

まず宮城県下のブタを対象にして香港型インフルエンザウイルス(H3N2)とブタ型インフルエンザウイルス(H1N1)に対する抗体調査を行ない、ヒトとブタにおいて発生した流行の間の関連性について疫学的に考察した。

1977年7月から1980年8月まで仙台市食肉検査所において毎月50頭ずつ採血し、血中HI抗体価を測定した。

香港型インフルエンザウイルスに対する陽性血清はほぼ全県から得られ、本ウイルスが既にブタ

の間に存在していたことが明らかとなった。1978年と1980年の春期に陽性率の増加が観察され、ヒトにおける香港型インフルエンザの流行と一致した季節的変動を示していた。1979年春にも低率ながら陽性血清が得られた。この時期、宮城県下のヒトの間では香港型インフルエンザの流行は全く認められなかったことから、ヒト流行株の潜在的病原果としてのブタの役割が注目された。陽性のブタ血清について各年代に流行した香港型インフルエンザウイルス変異株を用いて血清抗体を測定し、感染ウイルスの抗原型の推定を試みた。これにより、1973年の流行株に対して最も高い抗体価を示す血清が認められる一方、1980年のヒト流行株の感染例と考えられる血清も得られた。すなわち、ヒトの流行株がブタに伝播し、ブタからブタへ継代されることにより、複数の変異株が同時にブタ集団内に存在していることが示唆された。

ブタ型インフルエンザウイルスに関しては1977年9月に宮城県で初めて陽性血清が検出され、宮城県下のブタへ本ウイルスが侵入していたことが確認された。以後、2回の流行を経てその侵襲地域が全県にわたり拡大したことが明らかとなった。また、1978年4月に得られたブタの気管ぬぐい液からNew Jersey株と抗原的に近似する4株のH1N1株が分離され、ブタ型インフルエンザウイルスの

存在が確認された。これらの陽性血清のなかには香港型とブタ型のいずれの株に対しても反応するものも認められた。さらに、1農場のブタにおいて香港型とブタ型インフルエンザウイルスの遺伝的組換えウイルスと思われるH1N2株による流行が血清疫学的に観察された。また、1例ではあるがヒトのH1株の感染を示すブタ血清も得られた。

以上のように、宮城県下のブタの間には香港型およびブタ型インフルエンザウイルスによる2重流行の発生していたことが集団レベルの解析においてもまた、個体レベルの検索においても確認された。さらに、ブタはヒト流行株の病原巣として、また、抗原的に異なるウイルス株間の遺伝的組換えの場として重要な役割を果たす可能性のあることが示唆された。

次に、カモにおけるA型インフルエンザの流行を分離ウイルスの抗原性をもとに解析した。1976年から1981年までの5年間に捕獲された2,076羽のカモから合計41株のA型インフルエンザウイルスを分離した。これらの分離株のHA抗原は9種類、また、NA抗原は6種類に分類され、さらに、それらの組合せは18種類にのぼった。この成績は我が国に飛来するカモの間には多種類のインフルエンザウイルスが濃厚に浸淫していることを示すものと思われる。ある個体においてはHA抗原型の異なる

いくつかの変異株も同時に分離され、抗原的に独立した複数のウイルスに同時感染していたことが明らかとなった。さらに、それら同時感染例のうちの1例から抗血清存在下のクローニングにより、3株の異なるウイルス株を単離することに成功した。これらの成績は抗原型の異なる複数のウイルスの同時感染の結果として、カモの体内で遺伝的組換えウイルスの出現し得ることを示したものである。

1977年以降、ブタ由来のH1株とHA抗原性の共通する株がカモから多数分離され（カモ由来H1株）、動物種属を越えて広くウイルスが伝播する可能性が示唆された。特に1977年には、分離された26株のインフルエンザウイルスのうち13株がカモ由来H1株であり、さらにそのうちの9株は抗原的にも、また遺伝的にも均一な性状をもつウイルス群であることが確認された。すなわち、これらのカモの集団においてH1型による流行の起ったことが明らかとなった。

カモ由来H1株とブタ由来H1株との比較では、HAの抗原性とウイルスRNAの電気泳動像が大きく相違し、起源を共通にするウイルスとは考えられなかった。また、カモ由来H1株の抗原性はヒト由来H1株とも大きく相違していた。

ブタに対するカモ、ブタおよびヒト由来の各H1

株を用いた実験感染では、ブタはブタ由来H1株に対してのみ抗体応答を示したが、他の株に対しては抗体は検出されなかった。

以上の成績から、カモでは複数のインフルエンザウイルスの混合感染が成立し易く、その結果としての遺伝的組換えウイルス出現の重要な場となり得ることが明らかにされた。しかし、種類の異なる動物から分離された各種のH1株間のウイルス学的性状の比較では宿主域を越えた各ウイルスの直接伝播の証拠は得られなかった。野生鳥類におけるこのような多種類のA型インフルエンザウイルスの保有の果たす役割については今後もさらに研究する必要がある。

最後に、1977年から1978年にかけて仙台市を中心に発生した2種類の異なったA型インフルエンザウイルスによる同時流行に際して、これを血清疫学的およびウイルス分離の2つの側面からとらえて流行の解析を試みた。

420名の患者の咽頭ぬぐい液から88株のインフルエンザウイルス株を分離した。これらはH3N2型の56株とH1N1型の32株に区別され、他の抗原型のものは全く得られなかったことから、2種類のA型インフルエンザウイルスによる同時流行であったことが確認された。インフルエンザ流行前後に得られた中学生50名の組血清による血清学的診断

においても H3N2 型と H1N1 型による二重流行の発生していたことが明らかにされた。H3N2 型ウイルスの感染が確認された 12 名のうち 5 名が H1N1 型にも感染が確認され、短期間のうちに抗原型の異なるウイルスに二度感染したと考えられた。1978 年 2 月に得られた 1 名のインフルエンザ患者の咽頭ぬぐい液を発育鶏卵に接種してウイルスを増殖させ、さらに抗血清存在下でウイルスをクローニングすることにより H3N2、H1N1 および H3N1 型の 3 種の株を単離した。このうちの H3N1 型ウイルスは H3N2 と H1N1 型との間の遺伝的組換えウイルスと判断された。これらのウイルスがヒトの体内で出現したものかあるいは発育鶏卵内で発生したものかは不明であるが、いずれにしても二つの異なる株による同時感染の結果発生したことは明らかである。ブタおよびカモにおけると同様にヒト体内においても抗原型の異なる二種類のウイルス株の同時感染によって遺伝的組換えウイルスの出現する可能性が強く示唆された。

以上のように、ブタ、カモおよびヒトにおける A 型インフルエンザの流行解析の成績を比較した場合、いずれにおいても極めて類似した状況を有することが注目された。すなわち、いずれの集団においても複数のウイルス株が同時に存在し、かつ、流行の発生にまで発展していた。さらに、こ

これらの集団で同一個体において多重感染例も証明された。このような状況下では種を越えた動物間で自然感染が成立すれば容易に遺伝的組換えウイルスも出現し得ることが強く示唆された。

1980年アメリカ合衆国において肺炎で斃死したアザラシから抗原的にもまた遺伝的にもトリ由来と考えられるインフルエンザウイルス(H7N7)が分離された。これはトリ由来ウイルスが哺乳動物に対し強い病原性を示した初めての例として注目された^{23,31)}。トリ由来ウイルスの遺伝子のわずかな変化がアザラシに対する強い病原性をもたらしたと考えられる²²⁾。しかし、インフルエンザウイルスの病原性を規定する因子には不明な点が多く、病原性の発現には複数の遺伝子が同時に関与することを示す成績も報告されている^{42, 65)}。このため、シフト株もしくはヒト流行株が複数のインフルエンザウイルスの同時感染にもとづく遺伝的組換えによって出現する可能性についても考慮する必要がある。自然界におけるインフルエンザウイルスの生態を理解しつつ、ヒト流行株と動物のインフルエンザウイルス株のさらに詳細な比較・検討が必要である。

謝 辞

本論文の作製にあたり懇篤な指導、助言を賜った北海道大学獣医学部教授、橋本信夫博士に謹んで感謝の意を表します。また、草稿校閲の労をとられた同学部教授、梁川良博士、同教授、波岡茂郎博士および同教授、伊沢久夫博士に拝謝します。

本研究は、東北大学医学部教授、石田名香雄博士および熊本大学医学部助教授、山根誠久博士の指導のもとに遂行されたものであり、ここに謹んで謝意を表します。さらに、本研究の実行に際し多くの協力を賜った自治医科大学助手、小田切孝人博士に感謝します。また、疫学的調査に援助を賜った宮城県保健環境センター、助野典義博士および仙台市衛生試験場、熊坂滋郎の両氏に感謝します。

引用文献

1. 阿部武丸 (1972): 北海道居住馬のインフルエンザ抗体調査.
ウイルス 22, 125-132.
2. Aminoff, D. (1961): Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J. 81, 384-392.
3. Arikawa, J., Yamane, N., Totsukawa, K., Ishida, N. (1982): The follow-up study of swine and Hong Kong influenza virus infection among Japanese hogs. Tohoku J. exp. Med. 136, 353-358.
4. Arikawa, J., Yamane, N., Totsukawa, K., Odagiri, T., Ishida, N. (1983): Antigenic and genetic characterization of H1 influenza viruses isolated from feral ducks and swine in Japan. Arch virol. 78, 19-27.
5. Becker, W. B. (1963): The morphology of tern virus. Virology 20, 318-327.
6. Beveridge, W. I. B. (1977): Influenza: The last great plague. 岩波新書 「インフルエンザ 最後の大疫病」
林 雄次郎 訳
7. Bucher, D. Palese, P. (1975): The biologically active proteins of influenza virus: Neuraminidase. In: The influenza viruses and influenza. (Kilbourne, E.D. ed.), 83-123. Academic press, New York.
8. Bulletin of the world health organization. (1981): The

- ecology of influenza viruses: a WHO memorandum. Bull. WHO 59,869-873.
9. Butterfield, W.K., Campbell, C.H., Webster, R.G., Schortridge, K.F. (1978): Identification of a swine influenza virus (Hsw1N1) isolated from a duck in Hong Kong. J.infect.Dis. 138, 686-689.
 10. Centers for Disease Control. (1975): Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis. (Palmer, D. F., Coleman, M. T., Dowdle, W. R., Schild, G.C. eds.), U. S. Department of Health, Education and Welfare, Immunology Series No. 6, Atlanta.
 11. 江藤正信、酒匂光郎、熊野正己、角田俊誠、渡辺幸男、落合美和子、三嶋正水、小堀徳広、原芳雄(1978): 熊本県下のブタ型インフルエンザウイルスに対する抗体調査 第85回日本獣医学会抄録
 12. Fang, R., Jou, W. M., Huylebroeck, D., Devos, R., Fiers, W.(1981): Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin: Animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin. Cell 25, 315-323.
 13. 福見秀雄 (1979): 第4章 新型登場—理論、インフルエンザ 77-116、新宿書房、東京.
 14. 福見秀雄 (1979): 第7章 ワクチンと予防接種、インフルエンザ 173-205、新宿書房、東京.
 15. Glass, R. I. M., Brann, E. A., Slade, J. D., Jones, W. E., Scally, M. J., Craven, R. B., Grezz, M. B. (1978): From the centers for disease control. Community-wide survei-

- llance of influenza after outbreaks due to H3N2 (A/Victoria/75 and A/Texas/77) and H1N1 (A/USSR/77) influenza viruses, Mercer county, New Jersey, 1978. J. Infect. Dis. 138, 703-706.
16. Gordon, D. R. Jr. (1975): Influenza in man. In: The influenza viruses and influenza. (Kilbourne, E. D. ed.), 395-447. Academic Press. New York.
 17. Harkness, J. W., Schild, G. C., Lamont, P. H. Brand, C. M. (1972): Studies on relationships between human and porcine influenza. I. Serological evidence of infection in swine in Great Britain with an influenza A virus antigenically like human Hong Kong/68 virus. Bull. WHO 46, 709-719.
 18. Hinshaw, V. S., Webster, R. G., Turner, B. (1978): Novel influenza A viruses isolated from Canadian feral ducks: Including strains antigenically related to swine influenza (Hsw1N1) viruses. J. Gen. Virol. 41, 115-127.
 19. Hinshaw, V. S., Bean, W. J. Jr., Webster, R. G., Easterday, B. C. (1978): The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. Virology. 84, 51-62.
 20. Hinshaw, V. S., Webster, R. G., Turner, B. (1979): Water-borne transmission of influenza A viruses? Intervirology 11, 66-68.
 21. Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Webster, R. G., Sriram, G. (1980): Genetic reassortment of influenza A viruses in

- the intestinal tract of ducks. Virology 102, 412-419.
22. Hinshaw, V. S., Webster, R. G., Rodriguez, R. J. (1981): Influenza A virus: Combination of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources. Brief review. Arch. Virol. 67, 191-201.
 23. Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Webster, R. G., Rehg, J. E., Fiorelli, P., Early, G., Geraci, J. R., Aubin, D. J. St. (1984): Are seals frequently infected with avian influenza viruses? J. Virol. 51, 863-865.
 24. Jensen, K. E. (1956): Influenza viruses. In: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Disease, 2nd ed. 241. New York, American Public Health Association.
 25. Kendal, A. P. (1978): Working documents of international workshop on ecology of influenza virus, Washington D. C., U. S. A.
 26. Kendal, A. P., Noble, G. R., Skehel, J. J., Dowdle, W. R. (1978): Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977-1978 to "Scandinavian" strains isolated in epidemics of 1950-1951. Virology 89, 632-636.
 27. Kilbourne, E. D. (1968): Recombination of influenza A viruses of human and animal origin. Science 160, 74-76.
 28. Kilbourne, E. D. (1975): The influenza viruses and influenza- An introduction. In: The influenza viruses and influenza, (Kilbourne, E. D. ed.), 1-14. Academic Press, New York.
 29. Kida, H., Yanagawa, R., Matsuoka, Y. (1980): Duck

- influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect. Immun.* 30, 547-553.
30. Kundin, W. D. (1970): Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human pandemic in Taiwan. *Nature* 228, 857.
 31. Lang, G. (1981): Isolation of an influenza A virus from seals. *Arch. Virol.* 68, 189-195.
 32. Laver, W. G., Webster, R. G. (1972): Studies on the origin of pandemic influenza II. Peptide maps of the light and heavy polypeptide chains from the hemagglutinin subunits of A2 influenza viruses isolated before and after the appearance of Hong Kong influenza virus. *Virology* 48, 445-455.
 33. Laver, W. G., Webster, R. G. (1977): Hemagglutinin molecules of Hong Kong, equine-2, and duck/Ukraine influenza viruses lack N-terminal aspartic acid. *Virology* 81, 482-485.
 34. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
 35. 溝口徹、佐々木栄英、大村康治、山本明、小栗寿、辻周孝、川島守一、杉村宗明、小河孝、田中義夫、熊谷哲夫(1978): 静岡県下で発生した豚インフルエンザ。第86回日本獣医学会抄録 29.
 36. Morbidity and Mortality Weekly Report. (1976): U. S. Department of Health, Education and Welfare, 25, 47-48.
 37. Morbidity and Mortality Weekly Report. (1977): U. S.

- Department of Health, Education and Welfare, 26, 19.
38. 中島捷久、中島節子 (1980) : インフルエンザウイルスのゲノムとその転写. 蛋白質・核酸・酵素 25, 81-94.
 39. 中島捷久 (1982) : インフルエンザウイルス流行の分子レベルでの解析 — H3N2 ウイルスの起源 臨床とウイルス 10, 23-25.
 40. Nakajima, K., Nakajima, S., Sugiura, A (1982): The possible origin of H3N2 viruses. Virology 120, 504-509.
 41. 中島捷久 (1982) : 核酸ゲル電気泳動 ウイルス実験学各論 第2版. 500-509. 国立予防衛生研究所学友会編 丸善、東京.
 42. Nakajima, S., Sugiura, A (1980): Neurovirulence of influenza virus in mice. II. Mechanism of virulence as studied in a neuroblastoma cell line. Virology 101, 450-457.
 43. Nakamura, R. M., Easterday, B. D., Pawlisch, R., Welker, G. L. (1972) Swine influenza : Epizootological and serological studies. Bull. WHO 47, 481-487.
 44. Nishikawa, F., Sugiyama, T., Yamamoto, K., Yonemura, H. (1977) : Isolation of influenza type A viruses from imported pet birds. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 30, 31-36.
 45. 小河孝、笹原二郎 (1975) : 我国のブタにおける香港型インフルエンザの抗体調査. ウイルス 25, 67-68.
 46. Ottis, K., Bachman, P. A. (1980): Occurrence of Hsw1N1 subtype influenza A viruses in wild ducks in Europe. Arch. Virol. 63, 185-190.
 47. Palese, P., Schulman, T. L. (1976): Difference in RNA

- patterns of influenza A viruses. J. Virol. 17, 876-884.
48. Palese, P., Schulman, T. L. (1976): Mapping of the influenza virus genome : Identification of the hem-agglutinin and the neuraminidase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2142-2146.
 49. Scholtissek, C., Rohde, W., von Hoyningen, V., Rott, R. (1978) : On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. Virology 87, 13-20.
 50. Schulze, I. T. /(1975). The Biologically Active Proteins of Influenza Virus: The hemagglutinin. In : The influenza viruses and influenza, (Kilbourne, E. D. ed.), 53-82. Academic Press, New York.
 51. 芝田亮男、篠川至、庭山清一郎、岩瀬勇雄、武内守恵、福見秀雄 (1977): A swine 1型インフルエンザウイルスの分離と抗体調査成績. 第25回 日本ウイルス学会抄録 373.
 52. 芝田亮男、篠川至、庭山清一郎、岩瀬勇雄 (1978): A swine 1型インフルエンザウイルスの分離と抗体調査成績. 日本医事新報 2841, 43-49.
 53. Shope, R. E. (1931) : Swine influenza. I. Experimental transmission and pathology. J. Exp. Med. 54, 349-360.
 54. Shope, R. E. (1934) : The infection of ferrets with swine influenza virus. J. Exp. Med. 60, 49-61.
 55. Shope, R. E. (1936) : The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages. J. Exp. Med. 63, 669-684.
 56. Shortridge, K. F., Webster, R. G., Butterfield, W. K.,

- Campbell, C. H. (1977) : Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. *Science* 196, 1454-1455.
57. Smith, T. F., Burgert, E. O. Jr., Dowdle, W. R., Nable, G. R., Campbell, R. J., Ch, B., Van Scoy, R. E. (1976) : Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man. *New Engl. J. Med.* 294, 708-710.
58. Smith, W., Andrewes, C. H., Laidlaw, P. P. (1933) : A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 225, 66-68.
59. Stuart-Harris, C. H., Schild, G. C. (1976): The molecular virology and replication of influenza viruses. In : *Influenza the viruses and the disease*. 22-50. Edward Arnold, London.
60. Stuart-Harris, C. H., Schild, G. C. (1976) : The antigens of the influenza viruses. In : *Influenza the viruses and the disease*. 51-77. Edward Arnold, London.
61. Stubbs, E. L. (1961): Fowl Plague. In: *Diseases of Poultry*, 5th ed. (Biester, H. E., Schwarte, L. H. eds.), 813-822. Iowa State Univ. Press, Iowa, U. S. A.
62. 杉村崇明、片岡敏明、喜多英治、西野九一、笹原二郎 (1975) : 香港型インフルエンザウイルスによるブタの自然感染例. *ウイルス* 25, 19-24.
63. Sugimura, T., Yonemochi, H., Ogawa, T., Tanaka, Y., Kumagai, T. (1980) : Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw1N2) from swine in Japan. *Arch. Virol.* 66, 271-274.
64. Sugiura, A. (1975) : Influenza genetics. In : *The*

- influenza viruses and influenza. (Kilbourne, E. D. ed.), 171-213. Academic Press. New York.
65. Sugiura, A., Ueda, M. (1980): Neurovirulence of influenza virus in mice. I. Neurovirulence of recombinants between virulent and avirulent virus strains. Virology 101, 440-449.
 66. 武内 安恵 (1978) : 1977年11月から1978年3月までのインフルエンザの流行について. 臨床とウイルス 6, 175.
 67. Tsubokura, M., Otsuki, K., Yamamoto, H., Kawaoka, Y., Nerome, K. (1981) : Isolation of Hsw1Nav4 influenza virus from a tufted duck (*Aythya fuligula*) in Japan. Microbiol. Immunol. 25, 819-825.
 68. Webster, R. G., Campbell, C. H., Granoff, A. (1973) : The " in vivo " production of " new " influenza viruses. III. Isolation of recombinant influenza viruses under simulated conditions of natural transmission. Virology 51, 149-162.
 69. Webster, R. G., Laver, W. G. (1975) : Antigenic variation of influenza viruses. In : The influenza viruses and influenza. (Kilbourne, E. D. ed.), 269-314. Academic Press. New York.
 70. Webster, R. G., Laver, W. G., Tumova, B. (1975) : Studies on the origin of pandemic influenza virus. V. Persistence of Asian influenza virus hemagglutinin (H2) antigen in nature (?). Virology 67, 534-543.
 71. Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J.,

- Murti, K. G. (1978) : Intestinal influenza : Replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology 84, 268-278.
72. Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Van Wyke, K. L., Geraci, J. R., St. Aubin, D. J., Petursson, G. (1981) : Characterization of an influenza A virus from seals. Virology 113, 712-724.
73. WHO expanded programme on the ecology of influenza viruses consultation on the ecology of influenza viruses, London, 22-24, February 1979, summary of discussion.
74. 山根 誠久、有川二郎、小田切孝人、石田名香雄、助野典義、熊坂満郎 (1978) : 1977~1978年 宮城県における A型 インフルエンザの流行. 臨床エウロス 6, 66-72.
75. Yamane, N., Sukeno, N., Ishida, N. (1978) : Distribution of swine influenza antibody in Japan. Tohoku J. Exp. Med. 125, 325-330.
76. Yamane, N., Arikawa, J., Odagiri, T., Sukeno, N., Ishida, N. (1978) : Isolation of three different influenza A viruses from an individual after probable double infection with H3N2 and H1N1 viruses. Japan. J. Sci. Biol. 31, 431-434.
77. Yamane, N., Odagiri, T., Arikawa, J., Kumasaka, M., Ishida, N. (1979) : Effect of specific immunity to viral neuraminidase on subsequent influenza virus infection in man. Microbiol. Immunol. 23, 565-567.
78. Yamane, N., Arikawa, J., Odagiri, T., Ishida, N. (1979) :

- Annual examination of influenza virus infection among pigs in Miyagi prefecture, Japan: The appearance of Hsw1N1 virus. Acta Virol. 23, 240-248.
79. Yamane, N., Odagiri, T., Arikawa, J., Ishida, N. (1979) : Isolation and characterization of influenza A viruses from wild ducks in northern Japan: Appearance of Hsw1 antigens in the Japanese duck population. Acta Virol. 23, 375-384.
80. Yoden, S., Kida, H., Yanagawa, R. (1982) : An avian influenza of which infectivity is neutralized by antisera lacking HI activity. Arch. Virol. 74, 205-210.
81. Zhdanov, V. M., Lvov, D. K., Zakstelskaya, L. Ya., Yakhno, M. A., Isachenko, V. I., Braude, N. A., Reznik, V. I., Pysina, T. V., Andreyev, V. P., Podchernyaeva, R. Ya. (1978) : Return of epidemic A1 (H1N1) influenza virus. Lancet 11, 294-295.

Ecological studies of influenza virus infection
among humans, ducks and swine

Jiro Arikawa

Department of Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary medicine

Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Influenza type A virus is known to cause a pandemic of diseases among humans at approximately 10 year intervals. As it causes considerable loss thorough death of humans, the disease has been called " the last plague". Each pandemic is caused by different influenza type A viruses possessing HA or NA proteins which were antigenically unrelated to those of former one, and are called antigenic shift strains. Humans do not possess a protective antibody against the HA protein of the new shift strain. Therefore, an epidemic by this virus can spread rapidly to all parts of the world. However, the origin of the new pandemic (antigenic shift) strain still remains unknown.

Influenza type A virus contains eight RNA segments in the virion, and each segment codes for one polypeptide. Because of its segmented RNA form, influenza type A virus has been shown to cause a high frequency of genetic reassortment

during mixed infection with two influenza viruses in vitro and in vivo. Recently, it has been reported that HA protein of Hong Kong influenza virus is closely related to the HA protein of horse and duck origin viruses from the antigenic and genetic characterizations. The finding suggests that Hong Kong influenza virus arises after genetic reassortment between Asian (H2N2) and animal origin virus strains. Therefore, it has been hypothesized that a new shift strain arises through the genetic reassortment between human and animal origin viruses .

The present study was conducted to analyse the relationships of prevalence of influenza among humans, ducks and swine in Miyagi Prefecture, Japan. In addition, the possibility that genetic reassortment between human and animal origin viruses occurs in nature is discussed from virological and serological characterizations. The results were summarized as follows:

1. Seroepidemiological study of influenza virus infection in swine in Miyagi Prefecture was done during the period from July 1977 to August 1980. Fifty serum specimens were collected monthly from six-to-seven-month-old hogs. Hemagglutination inhibition (HI) antibody positive cases to Hong Kong (H3N2) influenza virus were observed throughout the prefecture. Positive ratios were increased in early spring in accord with the epidemic season in humans. In

March 1979, several seropositive cases were obtained, although no Hong Kong influenza prevalence was reported among humans in Miyagi Prefecture at that time. This finding shows that swine may serve as reservoirs of Hong Kong influenza virus. In the positive sera, HI antibody titers were compared with four different Hong Kong influenza virus variants isolated from 1968 to 1977 to analyse the infected strain. The results demonstrated that several different Hong Kong influenza virus variants were coexisting in swine populations of this area.

In the case of swine influenza virus (H1N1) infection among hogs in Miyagi Prefecture, seropositive cases began to appear from September 1977 in a small county in the north-eastern part of the prefecture. As no seropositive cases to swine influenza virus had been reported, invasion of the virus into swine populations in Japan was confirmed. The number of contaminated areas then spread throughout this prefecture until June 1979. Several serum specimens showed HI antibody against not only swine influenza virus, but also Hong Kong influenza virus. These swine were considered to infect serologically two different influenza type A viruses. A group of sera obtained from hogs in one farm represented the serum antibody against H1 and N2 antigen, but do not show H3 and N1. This serological examination clearly showed that

genetic reassortment virus between Hong Kong and swine influenza virus, possessing H1 and N2 enveloped antigen, caused endemic in this farm. In addition to Hong Kong and swine influenza virus infection, one serologically suspected case of human H1 influenza virus infection was also obtained. Serological examinations revealed that Hong Kong and swine influenza viruses were coexisting and caused the epidemic independently. And also, it was strongly indicated that pigs may play an important role in the development of genetic reassortment virus during double infection .

2. Isolation and characterization of influenza type A viruses were carried out from 2,076 wild ducks captured in Miyagi Prefecture from 1976 to 1981. A total of 41 influenza type A viruses was isolated from cloacal and tracheal swabs of wild ducks. HA and NA antigen of the isolates were classified as 9 and 6 different subtypes, respectively. The numbers of combination of HA and NA subtypes amounted to 18. In several cloacal swabs, three to five different HA subtypes could be detected. Moreover, three distinct virus strains were isolated from one specimen by the limiting dilution method; therefore, they were considered to infect several influenza virus strains at the same time. These results demonstrated that many kinds of influenza type A viruses were coexisting among the duck populations and that mixed infection also frequently occurred. This finding suggested that

genetic reassortment virus may arise frequently in nature.

Since 1977, H1 influenza viruses which possess HA antigen related to swine influenza virus (H1N1) have been isolated from ducks. These duck origin H1 viruses showed homologous characteristics to each other in the HI test and viral RNA patterns on polyacryl amide gel electrophoresis and oligonucleotide mapping. Therefore, it was apparent that this strain caused the epidemic in the duck population. Although the HA of the duck origin viruses was identified as H1, the viruses were distinguishable from H1 virus isolated from swine and humans. The viral RNA patterns of the duck and swine origin H1 viruses were found to be quite different, indicating that genetic reassortment of HA genes between them is unlikely. After the duck origin H1 influenza virus was intranasally inoculated into pigs, a brief period of virus recovery with no serological response was observed; whereas swine origin H1N1 virus produced seroconversion in the pigs inoculated.

3. Influenza epidemic in humans was analysed by virus isolation and seroepidemiological procedures during an epidemic season between 1977 and 1978. A total of 88 influenza type A viruses was isolated from 420 pharynx swabs of influenza-like patients in Sendai City. The viruses were 56 H3N2 virus and 32 H1N1 virus, indicating that two differ-

ent influenza type A viruses caused epidemics independently during this winter season.

In the serological examination of 50 paired sera collected from junior high school students in Sendai City before and after the epidemic season, seroconversion cases to Hong Kong strain or H1 strain were observed. Five out of 12 seroconversion cases to Hong Kong influenza virus were also positive to H1 influenza virus. Therefore, these five cases were serologically considered to have been infected with two different influenza viruses during this epidemic season. From a pharynx swab of one influenza-like patient, three different influenza virus strains (H3N2, H1N1 and H3N1) were isolated by the limiting dilution method. This patient was found to have been infected with Hong Kong and H1 influenza viruses at the same time. In cases in which two different type A influenza viruses coexist, humans may also serve an important role in bringing about genetic reassortment virus during mixed infection.